



**TYÖOHJEEN LAATIMINEN DNA-TUTKIMUSMENETELMILLE
MOSAMBIKIN BIOANALYTIIKAN KOULUTUSOHJELMAN MO-
LEKYLIBIOLOGIAN JA GEENITEKNOLOGIAN HARJOITUS-
KOKONAISUUTEEN**

Opinnäytetyö

**Niko Jauhiainen
Milka Juntunen
Eliisa Lahtinen**

Bioanalytiikan koulutusohjelma

Molekyylibiologia ja geeniteknologia

Hyväksytty _____._____._____

SAVONIA- AMMATTIKORKEAKOULU

Terveysala, Kuopio

OPINNÄYTETYÖ

Tiivistelmä

Koulutusohjelma: Bioanalytiikan ko.	
Suuntautumisvaihtoehto: Molekyylibiologia ja geeniteknologia	
Työn tekijä(t): Niko Jauhiainen, Milka Juntunen ja Eliisa Lahtinen	
Työn nimi: Työohjeen laatiminen DNA-tutkimusmenetelmille Mosambikin bioanalytiikan koulutusohjelman molekyylibiologian ja geeniteknologian harjoituskokonaisuuteen.	
Päiväys: 7.12.2009	Sivumäärä / liitteet: 68/3
Ohjaajat: Lehtori Eila Räsänen	
Työyksikkö / projekti: Instituto Superior de Ciências de Saúde (ISCISA), Maputo, Mosambik	
<p>Eräs oppimateriaalin laji on työohje ja sen tehtävä on tukea oppimista muun opetuksen apuna. Laboratoriossa työohje on tyypillinen materiaali, jonka tarkoitus on kuvata tietyn toiminnan yksittäiset työvaiheet. Työohje on tärkeä oppimateriaali myös bioanalytiikan koulutusohjelmassa, jossa se tukee opiskelijoiden ammatillista kasvua.</p> <p>Tämän opinnäytetyön kehittämistyönä laadittiin kuvallinen työohje molekyylibiologian ja geeniteknologian osa-alueelta bioanalytiikan koulutusohjelman käyttöön Instituto Superior de Ciências de Saúde (ISCISA) Mosambikiin. Työohje käsittelee DNA-tutkimusmenetelmiä, joihin lasketaan kuuluvaksi DNA:n eristäminen ja sen pitoisuuden mittaaminen, PCR-monistaminen sekä DNA:n erottelu ja tunnistaminen agarosigeelielektroforeesilla.</p> <p>Opinnäytetyön teoriaosuudessa käsitellään kahta pääaihetta. Ensimmäisenä käsitellään DNA:ta ja sen rakennetta sekä työohjeen sisältämien DNA-tutkimusmenetelmien teoreettista taustaa. Toisena käsiteltävänä aiheena on oppimateriaali sekä sen laatimisessa ja arvioinnissa käytettävät laadukriteerit. Opinnäytetyön tuotos eli työohje on rakennettu teoriaosion pohjalta.</p> <p>Kehittämistyön tehtävät olivat tiedon kerääminen, sisällön laatiminen työohjeelle kerätyn tiedon pohjalta, työohjeen testaaminen sekä arviointi. Työohje sisältää käytettyjen DNA-tutkimusmenetelmien teoriaa, tarvittavien välineiden luettelon, eri työvaiheet sekä kuvia niistä. Havainnollistamisen keinona käytetyt kuvat otettiin työohjeen testaamisen aikana. Varsinaisen työohjeen lisäksi laadittiin yleiset työskentelyohjeet. Laadinnassa hyödynnettiin sisältöön, ulkoasuun, kieliasuun ja kokonaisuuteen sisältyviä kriteerejä.</p> <p>Alan asiantuntija arvioi valmiin työohjeen laadittujen kysymysten perusteella. Kysymykset pohjautuivat kirjallisuudesta saatuihin kriteereihin. Asiantuntijan palautteen ja kehittämisohjeiden perusteella tehtiin muutoksia työohjeen sisältöön. Palaute ulkoasusta ja kokonaisuudesta oli myönteistä. Lopullinen tuotos lähetettiin Mosambikiin sähköisessä muodossa Word-tiedostona.</p>	
Avainsanat: DNA, DNA:n eristäminen, polymeerasiketjureaktio, agarosigeelielektroforeesi, oppimateriaali	
Julkinen <u> X </u>	Salainen <u> </u>

THESIS**Abstract**

Degree Programme: Biomedical Laboratory Science	
Option: Molecular biology and gene technology	
Authors: Niko Jauhiainen, Milka Juntunen ja Eliisa Lahtinen	
Title of Thesis: Composing the working instructions from DNA-researching methods to molecular biology and gene technique practice to Biomedical laboratory science Degree programme in Mozambique.	
Date: 7.12.2009	Pages / appendices: 68/3
Supervisor: Senior lecturer Eila Räsänen	
Contact persons: Instituto Superior de Ciências de Saúde (ISCISA), Maputo, Mozambique	
<p>Working instructions are one form of learning material. The meaning of teaching materials in addition to other teaching methods is to support learning. In laboratory working instructions are typical teaching material and their purpose is to describe specific working stages of certain procedure. Working instructions are important learning material also in the degree programme of Biomedical laboratory science and so they will support students' professional development.</p> <p>In this thesis there was composed illustrated working instructions from occupational field of molecular biology and gene technology for use in degree programme of Biomedical laboratory science in Instituto Superior de Ciências de Saúde (ISCISA) in Mozambique. The working instructions contain DNA researching methods which include following phases: DNA isolation, concentration measurement of DNA, PCR amplification, separation and identification of DNA using gel electrophoresis.</p> <p>There are two main theoretical subjects in the thesis. In the first subject there is described what DNA is and what is its structure. In addition theoretical backgrounds of DNA researching methods are described. The second subject contains the theory of teaching material and the quality criteria which are used in composition and evaluation of teaching material. The working instructions have been composed based on these theoretical facts.</p> <p>The phases of composing the working instructions were finding the theory and building the content based on that theory, testing the working instructions and evaluating them. The working instructions contain theory of used DNA researching methods, the list of needed materials, different working stages and pictures from them. Pictures which are used as demonstration were taken by us during testing the working instructions. In addition was composed common working instructions. In designing of instructions criteria of content, appearance, wording and entirety were utilized.</p> <p>The field expert evaluated the final working instructions based on questions that we had made. The questions were based on criteria received from literature. Changes to the content of the working instructions were made based on feedback and advice of development given by the expert. Feedback from appearance and entity was positive. The final working instructions were sent to Mozambique in Word-file by e-mail.</p>	
Keywords: DNA, DNA isolation, polymerase chain reaction, agarose gel electrophoresis, teaching material	
Public <u> X </u>	Secure <u> </u>

SISÄLTÖ

1	JOHDANTO.....	5
2	DNA JA SEN RAKENNE	7
3	DNA-PERUSTUTKIMUSMENETELMÄT	9
3.1	Yleisiä työskentelyohjeita.....	9
3.2	DNA:n eristäminen.....	12
3.3	DNA:n pitoisuuden mittaaminen	13
3.4	PCR- monistaminen.....	14
3.5	DNA:n erottelu elektroforeesilla	16
4	TYÖOHJE OPPIMATERIAALINA.....	19
4.1	Oppimateriaali ja sen tuottaminen	19
4.2	Oppimateriaalin suunnittelun ja laadun arvioinnin kriteerit.....	21
4.3	Kuvat osana oppimateriaalia.....	25
5	KEHITTÄMISTYÖN TEHTÄVÄT	26
6	KEHITTÄMISTYÖN TOTEUTUS.....	26
6.1	Tiedon kerääminen	26
6.2	Työohjeen laatiminen.....	27
6.3	Työohjeen testaaminen.....	29
6.4	Työohjeen arvioiminen.....	34
7	POHDINTA.....	35
	LÄHTEET	43

LIITTEET

Liite 1. Yleiset työskentelyohjeet	49
Liite 2. Työohje DNA-tutkimusmenetelmille	53
Liite 3. Työohjeen arviointilomake.....	67

1 JOHDANTO

Tämän opinnäytetyön kehittämistyön taustalla on yhteistyö Savonia-ammattikorkeakoulun Kuopion terveystieteiden yksikön sekä Mosambikissa, Maputoissa sijaitsevan korkea-asteen oppilaitoksen, Instituto Superior de Ciências de Saúde (ISCISA), välillä. Kuten Savonia-ammattikorkeakoulussa myös ISCISA:ssa on bioanalytiikan koulutusohjelma. ISCISA:n oppilaitoksessa on aloitettu molekyylibiologian ja geeniteknologian teoriaopetus, mutta monipuolisesta harjoitustöiden oppimateriaalista on puutetta.

Mosambik on yksi maailman köyhimmistä maista. Se sijaitsee eteläisessä Afrikassa Intian valtameren rannalla naapurimaanaan Etelä-Afrikka, Swazimaa, Zimbabwe, Malawi ja Tansania. Asukkaita Mosambikissa on noin 20 miljoonaa. Maan talous on pitkälti riippuvainen ulkomaisesta kehitysavusta sekä rajanaapuristaan Etelä-Afrikasta. Viimeisten vuosikymmenien aikana maan talous on kasvanut ja ihmisten hyvinvointi parantunut. (Ulkoasiainministeriö 2006a.) Mosambikin virallinen kieli on portugali (Suomen suurlähetystö, Maputo 2009).

ISCISA:n oppilaitoksen edustajat ovat ilmaisseet tarpeen molekyylibiologian ja geeniteknologian oppimateriaaleille, sillä he haluavat kehittää bioanalytiikan koulutusohjelmaa ja erityisesti monipuolistaa harjoitustöiden opetusta oppilaitoksessaan. Myös Helsingin ammattikorkeakoulun opettaja, terveystieteen tohtori Anneli Sarajärvi (2003, 171) korostaa harjoittelun merkitystä oppimiselle. Sarajärvi toteaa, että opiskelijat pitävät harjoittelua tärkeänä, sillä sen aikana opiskelija perehtyy ammatin keskeisiin työtehtäviin. Harjoituksissa opiskelija soveltaa tietoja ja taitoja yhdistämällä tieteellisen tiedon käytännön tilanteisiin (Sarajärvi 2003, 171). Laaksonen (2005, 131–132) korostaa, että perinteinen, luennoija-keskeinen ja opiskelijaa passivoiva luennointi tekee oppimisesta helposti tehotonta ja pintapuolista. Opetusta ja oppimista onkin kehitettävä kohti opetusta, joka tukee opiskelijoiden aktiivisuutta ja huomioi yksilöllisiä lähtökohtia. (Laaksonen 2005, 131–132.) Näiden perustelujen mukaan myös ISCISA:n opetuksen ja erityisesti harjoitustöiden monipuolistamisesta seuraava opetuksen kehittyminen

johtaa parempaan opetuksen vaikuttavuuteen ja opiskelijoiden parempiin oppimistuloksiin.

ISCISA:n edustajat ovat ilmaisseet tarpeen erityisesti oppimateriaalille, joka olisi opetusvideon tai työohjeen muodossa. Aikaisemmin Savonia-ammattikorkeakoulusta on tuotettu oppimateriaalia ISCISA:n molekyylibiologian ja geeniteknologian teoriaopetukseen. Oppimateriaalin tuottivat Huttunen ja Lahti (2007) PowerPoint-muodossa ja se käsitteli DNA:n (deoksiribonukleiinihapon) teoriaa ja tutkimusmenetelmiä. Kyseisen opinnäytetyön kehittämishaasteena tekijät olivat myös ilmaisseet tarpeen tehdä työohje DNA-tutkimusmenetelmistä. Näillä perusteilla opinnäytetyön kehittämistyöksi valittiin työohjeen laatiminen DNA-tutkimusmenetelmistä.

DNA-tutkimusmenetelmiä käytetään nykypäivänä terveydenhuollossa ja niiden merkitys kasvaa koko ajan. Palotien (2006) mukaan nykypäivän teknologia mahdollistaa jo perimän kaikkien geenien tarkan kartoituksen yksilössä. Teknologinen kehitystyö on tuottanut mahdollisuuden tunnistaa yksilöllisiä vaihteluita geenien rakenteissa ja analysoida muutoksia geenien luennassa yksilön kasvun, vanhenemisen ja erilaisten tautiprosessien aikana. Tutkimuksista saatava tieto perimästä lisääntyy päivittäin. Nykypäivän perinnöllisyystieteen tulisikin auttaa kansalaisia tämän nopeasti lisääntyvän tiedon merkityksen selittämisessä heidän terveyden ja sairastumisriskin kannalta. (Palotie 2006, 6.)

Tavoite. Tässä kehittämistyössä on kaksi välitöntä tavoitetta. Ensimmäinen tavoite on laatia mahdollisimman havainnollistavaa oppimateriaalia. Toinen tavoite on kehittää ISCISA:n bioanalytiikan koulutusohjelman opetusta sekä auttaa bioanalytiikan opiskelijoita heidän opinnoissaan laaditun työohjeen avulla. Nämä välittömät tavoitteet kuvaavat muutoksia, jotka saadaan aikaan välittömästi projektivaiheen jälkeen (Silfverberg 1997, 50). Vastaavasti pitkän ajan muutoksia voidaan Silfverbergin (1997, 50) mukaan kuvata kehitystavoitteella. Tässä kehittämistyössä tavoite on se, että opiskelijat pystyvät hyödyntämään oppimiaan tietoja ja taitoja myöhemmin työelämässä. Lopulliset tulokset voidaankin saada näkymään vasta pitkän kehitysprosessin jälkeen (Silfverberg 1997, 50).

Kehittämistyön yksi jo aiemmin mainittu välitön tavoite on auttaa koulutuksen kehittämistä ISCISA:ssa. Laaksonen (2005) toteaaakin korkeakouluopetuksen kehittämistutkimuksessaan, ettei opetuksen ja oppimisen laadun kehittäminen ole yleinen trendi, vaan ennemmin vaatimus kaikille koulutusinstituutioille. Kyseessä on prosessi, jossa pienillä uudistuksilla on mahdollista saavuttaa suuria myönteisiä muutoksia. (Laaksonen 2005, 131–132.) Koulutus on myös tehokas tapa vähentää köyhyyttä ja edistää maan kehitystä (Ulkoasiainministeriö 2006b). Näillä perusteilla myös tällä kehittämistyöllä on mahdollista saavuttaa myönteisiä muutoksia ISCISA:n bioanalytiikan koulutusohjelmaan sekä tulevaisuudessa Mosambikin terveydenhuoltoon.

Tarkoitus. Tämän kehittämistyön tarkoituksena on laatia englanninkielinen työohje molekyylibiologian ja geeniteknologian harjoitustyökokonaisuuteen, jonka myötä opiskelijat saavat perusvalmiudet DNA-tutkimusmenetelmien toteuttamiseen. Runkona toimii työohje, jota käytetään Savonia-ammattikorkeakoulun molekyylibiologian ja geeniteknologian harjoituskokonaisuudessa. Työohje laaditaan DNA-identifikaatiotutkimukselle, joka on keino opettaa DNA-perustutkimusmenetelmiä. Työohje sisältää DNA:n eristämisen, pitoisuuden mittauksen, monistuksen sekä erottelun ja tunnistamisen. Työohjeen laadinnassa hyödynnetään kuvia ja kuvasarjoja havainnollistamisen keinona. Kuvallinen oppimateriaali on myös ISCISA:sta tullut toive.

2 DNA JA SEN RAKENNE

Deoksiribonukleiinihappo (DNA) on molekyyli, joka sisältää yksilön rakennetta ja toimintaa ohjaavan tiedon eli perimän. DNA osallistuu elimistön proteiinien tuotantoon eli synteisiin ohjaamalla aminohappojen järjestymistä proteiineissa. (Brownie & Kernohan 2005, 176.) DNA-ketjun toiminnalliset yksiköt eli geenit sisältävät proteiinien synteisiin tarvittavan informaation (Frilander 2006, 15). Ihmisellä kaksijuosteinen DNA sijaitsee pääasiassa solun tumassa sekä osittain

mitokondriossa (Brownie & Kernohan 2005, 176). Ihmisen DNA esiintyy tuman kromosomeissa kromatiinina, eli histoniproteiinien ja DNA:n muodostamana tiiviinä rihmana (Vuorio 2002, 19–20).

DNA:n perusrakenneosia ovat nukleotidit, jotka koostuvat deoksiriboosista eli sokeriosasta, fosforihappotähteestä sekä puriini- tai pyrimidiiniemäksestä (adeniini, tymiini, sytosiini ja guaniini). Molekyylin rakenteellisena selkärankana toimii sokeri-fosfaattiketju, johon informaatiota välittävät emäkset ovat kiinnittyneet. DNA muodostuu kahdesta ketjusta, joiden välillä olevat emäkset pariutuvat aina tietyllä tavalla: adeniinit guaniinien kanssa sekä tymiinit sytosiinien kanssa. DNA muodostaa kaksoisheliksin, joka tekee yhden täyden kierroksen jokaista kymmentä emäsparia kohti. Kaksoisheliksi pysyy kasassa emäsmolekyylien hydrofobisen vuorovaikutuksen sekä emäksien välillä olevien vetysidosten ansiosta. (Vuorio 2002, 17–20.)

Nukleotidiketjun päitä nimitetään 3'- ja 5'-päiksi. Molekyylin 5'-päiksi sanotaan sitä päätä, jossa deoksiriboosin 5'-hiili ei osallistu fosfodiesterisidoksen muodostumiseen ja 3'-päiksi sitä, jossa deoksiriboosin 3'-hiilen hydroksyyli-ryhmä (OH) on vapaa. (Vuorio 2002, 17–18.) Fosfaatti on aina sitoutunut ketjun edellisessä deoksiriboosissa 3'-hiileen ja ketjun jälkimmäisessä deoksiriboosissa 5'-hiileen. Tämä tarkoittaa, että nukleotidien emäsjärjestys eli sekvenssi kirjoitetaan aina 5'-päältä alkaen 3'-pään suuntaan. Näin ollen nukleotidiketjulla on tietty suunta, mikä tekee selkärangan rakenteesta polaarisen, jolloin negatiivinen ja positiivinen varaus pitävät molekyylin kasassa. (Suominen & Ollikka 1997, 19.)

3 DNA-PERUSTUTKIMUSMENETELMÄT

3.1 Yleisiä työskentelyohjeita

DNA-tutkimusmenetelmät asettavat niiden parissa työskentelylle tiettyjä kriteereitä, joita tulee tarkasti noudattaa. Työtekniikoiden tulee olla sellaisia, jotka noudattavat mikrobiologian ja hyvän työhygienian vaatimuksia sekä steriiliyttä. Nämä asiat on tärkeää muistaa DNA:n kanssa työskennellessä, sillä se on erittäin herkkä kontaminoitumaan. (Suominen & Ollikka 1996.) Kontaminaation välttäminen tulee ottaa huomioon jo näytteenotossa (Penttilä 2003, 115). Ainoastaan näytteen suojaaminen kontaminaatiolta ei riitä, sillä DNA-tekniikoissa käytetään paljon haitallisia aineita. Näin ollen omaan turvallisuuteen ja suojautumiseen tulee myös kiinnittää huomiota. (Suominen & Ollikka 1996.)

Kaikki välineet, materiaalit ja aineet, jotka ovat kosketuksissa tutkittavien organismien kanssa, tulee steriloida, jotta mahdollisilta mikrobikontaminaatiolta välttäisiin (Suominen & Ollikka 1996). Steriloinnin tavoite onkin tuhota steriloitavissa tuotteissa olevat mahdolliset mikro-organismit (Hirvonen 2008, 207). DNA-työskentely vaatii myös nukleaasivapaat olot. Tämä tarkoittaa sitä, että pipetinkärjet, liuokset, puskurit ja putket tulee steriloida kuumentamalla ennen käyttöä, jotta DNA:ta hajottavat entsyymit eli nukleaasit tuhoutuvat. Toinen vaihtoehto on käyttää jo valmiiksi steriloituja kertakäyttövälineitä. Nukleaaseja on kaikkialla esimerkiksi iholla, joten kertakäyttökäsineiden käyttö on ehdottoman tärkeää ja niitä tulee vaihtaa riittävän usein. Nukleaasit saadaan tuhottua DNA:ta sisältävistä liuoksista kuumentamalla liuosta 65 asteessa 10 minuutin ajan. (Suominen & Ollikka 1996.) Erityisesti tutkimuslaitoksissa steriloinnilla pyritään minimoimaan tutkimusten virhelähteitä ja näin ollen tarjoamaan luotettavia tutkimustuloksia (Hirvonen 2008, 207).

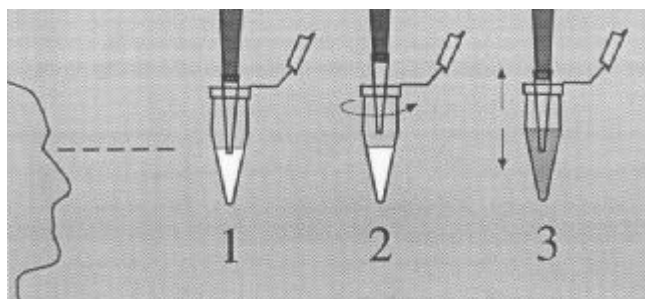
Pipetinkärkiä tulee vaihtaa jokaisen pipetoinnin välillä. Tämä on tärkeää muistaa näytteen kontaminaatoriskin takia sekä pipetoitaessa esimerkiksi entsyymejä, sillä ne ovat kalliita ja kontaminoituvat helposti. Aineiden arvokkuuden takia

myös niiden säilytyksen kontrolloimisesta tulee pitää kirjaa. Pipetinkärkien säilytystä tulee laittaa kiinni silloin, kun niitä ei käytetä. PCR-työskentelyssä kannattaa käyttää pipetinkärkiä, joissa on pieni suodatin estämässä aerosolien kulkumista pipetin runko-osan ja pipetoitavan liuoksen välillä. Näin vältetään DNA-liuosten ristikontaminoituminen. (Suominen & Ollikka 1996.)

Nukleiinihappotöissä pipetoitavat määrät ovat hyvin pieniä, joten niiden pipetoinnissa tulee olla erittäin tarkkaavainen. Joidenkin aineiden pipetointiin tuo oman vaikeutensa niiden viskoosius. Tällaisia ovat esimerkiksi entsyymit, jotka sisältävät glyserolia. Pipetointia kannattaakin harjoitella esimerkiksi kylmällä 50 % glyseroliliuoksessa ennen kalliiden entsyymien pipetointia. Pipetointi tekniikkaan tulee myös kiinnittää huomiota. (Suominen & Ollikka 1996.) Pieniä tilavuuksia sekä viskooseja ja helposti haihtuvia liuoksia mitattaessa kannattaa hyödyntää käänteistä pipetointimenetelmää. Käänteinen menetelmä antaa myös parhaan tarkkuuden ja toistettavuuden. (Thermo Fisher Scientific Oy 2008, 5.) Pipettien oikeaan käyttöön kuuluu pipetointitekniikoiden lisäksi pipettien säännöllinen kalibrointi. Kalibroinnin tarkoitus on varmistua mittausvälineen luotettavuudesta määrittämällä sen mittaustarkkuus. Mittaustarkkuudella kuvataan sitä eroa, mikä on mittaustuloksen sekä todellisen arvon välillä. Tarvittaessa pipetit tulee myös huoltaa, virittää ja puhdistaa. (Hänninen ym. 2007, 67, 69.)

Pipetoidessa pieniä määriä, kannattaa putki nostaa aina silmien tasalle, jolloin voidaan varmistua siitä, että pipetoitava neste menee varmasti haluttuun paikkaan (kts. KUVA 1.). Aloitettaessa pipetointia pipetin mäntä painetaan alas ja kärki lasketaan hieman nestepinnan alapuolelle (kts. KUVA 1, kohta 1.). Kärkeä pidetään muutama sekunti nestepinnan alapuolella ennen kuin se täytetään. Pipetti täytetään nostamalla mäntää hitaasti ja tasaisesti. Tällainen pipetointitapa toimii erityisesti pipetoitaessa viskooseja nesteitä, esimerkiksi entsyymejä. Pipetinkärjen tulee myös olla hyvin kiinnitettynä pipettiin, jotta nesteen sijasta kärkeen ei joudu ilmaa. Pipetoidessa pieniä määriä, on oltava hyvin huolellinen, että pipetoi tarkan määrän lopulliseen seokseen. Näin ollen pipetin kärjen ulkopuolelle tarttuva neste tulee ottaa huomioon. Tästä ylimääräisestä aineesta, voi päästä eroon esimerkiksi pyöräyttämällä pipetin kärkeä pari kertaa putken sisäreunaa vasten (kts. KUVA 1, kohta 2.). Tämän jälkeen pipetinkärki siirretään

vastaanottoputkeen hieman nestepinnan alapuolelle ja painetaan mäntä alas (kts. KUVA 1, kohta 3.). Samalla tulee seurata, että neste päätyy vastaanotto-putkeen. (Suominen & Ollikka 1996.)



KUVA 1. Pipetoitaessa pieniä määriä putki tulee nostaa silmien tasolle (Suominen & Ollikka 1996.)

Laboratorioissa, joissa käsitellään DNA:ta, joudutaan käyttämään jonkin verran haitallisia aineita, joten voimassa olevia työturvallisuusmääräyksiä on hyvä noudattaa. Yksi käytetyistä haitallisista aineista on karsinogeeniksi luokiteltu etidiumbromidi, jota käytetään DNA:n visualisoimiseen agarosigeelillä. (Suominen & Ollikka 1996.) Ethidiumbromidi on myrkyllinen mutageeni (Dieffenbach & Dveksler 2003b, 496). Etidiumbromidia käsiteltäessä tulee aina käyttää suojakäsineitä ja suojatakia. Etidiumbromidijätteet laitetaan aina erillisiin ongelmajätteastioihin. UV- eli ultraviolettivaloa tarvitaan tarkasteltaessa ja kuvattaessa agarosigeeliä. Silmät on suojattava UV-valolta riittävän tehokkailla suojalaseilla ja paljas iho tulee suojata suojavaatteilla. (Suominen & Ollikka 1996.)

Niin kuin muissakin laboratoriotutkimuksissa myös DNA-tutkimuksissa kontrollointi on erityisen tärkeää. Kontrollinäytteistä saatujen tulosten avulla voidaan päätellä, onko analyysisysteemissä jotain korjattavaa ja ovatko saadut tulokset hyväksyttäviä vai pitääkö ne hylätä. Kontrolloinnin periaatteena on se, että tuotettu tutkimustulos on luotettava. (Linko ym. 2000, 156–157.) Yksi kontrolloinnin muoto DNA-tutkimuksissa on agarosigeelille laitettavat kokostandardit, joiden on aina oltava ajossa mukana. Kontrollien tekeminen ei yleensä aiheuta paljon lisätöitä, mutta niitä käyttämällä säästyy yleensä turhalta työltä. Jos jokin asia

menee vikaan, on se yleensä helposti pääteltävissä ja korjattavissa kontrollien avulla. (Suominen & Ollikka 1996.)

3.2 DNA:n eristäminen

DNA:n tutkimisen kannalta on olennaisen tärkeää, että pientä määrää nukleiinihappoja saadaan vahvistettua. Tähän on kehitetty useita erilaisia menetelmiä, joista vakiintunein on polymerase chain reaction (PCR). DNA:n eristäminen on välttämätön menetelmä PCR-prosessissa. Eristämisen tarkoituksena on sekä eristää että puhdistaa lähtömateriaalia PCR-monistusta varten. DNA:ta voidaan eristää useasta eri materiaalista kuten verestä, kudoksista sekä viljellyistä soluista. (Smith, Otto, Bitner & Shield 2003, 87.) Lähtömateriaalin sisältämän DNA:n puhdistus ja konsentrointi näytteen keräyksestä analyysiin asti ovat kriittisiä vaiheita, jotka vaikuttavat huomattavasti PCR:n onnistumiseen (Dieffenbach & Dveksler 2003a, 83).

Onnistunut DNA:n eristäminen vaatii menetelmän, joka estää tuman turmeltumisen sekä poistaa PCR-monistuksen estävät tekijät. Genomisen DNA:n eristämiseen on kehitetty monia erilaisia menetelmiä. Paras menetelmä kuhunkin tilanteeseen valitaan DNA-tyypin ja -koon, lähtömateriaalin, saannin, puhtauden, läsnä olevien kontaminaatiolähteiden, automaation ja yhden eristyksen hinnan mukaan. DNA:n eristämisen helpottamiseksi on tehty erilaisia kaupallisia reagenssisarjoja ja niiden mukana on aina yksityiskohtaiset työohjeet. Eristys voidaan myös toteuttaa valmistamalla liuokset itse. (Smith, Otto, Bitner & Shield 2003, 87.)

DNA:n eristäminen aloitetaan keräämällä lähtömateriaalia, jossa on DNA:ta. Yksi käytetty lähtömateriaali on kokoveri. Ennen DNA:n saostamista kokoveressä olevat punasolut, valkosolujen solukalvot sekä tumakotelot, hajotetaan käsittelemällä ne proteinaasi K-entsyymillä EDTA:n (etyleenidiamiinitetraetikkahappo) ja SDS:n (natriumdodekyylisulfaatti) läsnä ollessa. Näytteestä joudutaan poistamaan myös osa proteiineista saostamalla. Lisäämällä natriumkloridia ja sentrifugoimalla saadaan proteiinit laskeutumaan näyteputken pohjalle. DNA jää

vesifaasiin putken yläosaan, josta sen voi pipetoida jatkokäsittelyä varten. (Smith, Otto, Bitner & Shield 2003, 88; Suominen & Ollikka 1997, 61–64.)

Esikäsittelyvaiheiden jälkeen DNA:n saostaminen on mahdollista. Yleisin tapa saada DNA määrällisesti talteen on saostaa se etanolilla. DNA saostuu 70-prosenttisessa etanolissa tai noin 40-prosenttisessä isopropanolissa, joissa molemmissa on riittävästi yhdenarvoisia kationeja. DNA saostuu ainoastaan suoloina. Tämän takia on tärkeää, että kationeja on läsnä, sillä muuten saostumista ei tapahdu. Kationisuolojen ja etanolin lisäyksen ja sekoituksen jälkeen DNA saostuu. Saostuminen on tehokkainta kylmässä, mutta se voidaan suorittaa myös huoneenlämmössä. Tämän jälkeen saostunut DNA sentrifugoidaan putken pohjalle. Jos DNA:ta on vähän, tulee sentrifugointi aikaa kasvattaa. Sakka ei ole näkyvässä, jos se on hyvin puhdasta tai sitä on vähän. Tämän jälkeen supernatantti eli nestemäinen osa sakan päällä otetaan pois ja samalla varotaan koskemasta pellettiin, eli putken pohjalla olevaan sakkaan. Pellettiä kannattaa vielä kuivata hetki ennen pesun aloittamista. Käytettäessä isopropanolia sakan voi pestä kertaalleen absoluuttisella etanolilla ennen kuivaamista. Pesun jälkeen supernatantti poistetaan samalla tavalla kuin aiemmin. Tässä vaiheessa tulee noudattaa erityistä varovaisuutta, koska sakka irtoaa helposti putken seinältä. Lopputuote kuivataan vielä kerran, jonka jälkeen se liuotetaan. Liuottamisella vältetään DNA:n kuivuminen. (Suominen & Ollikka 1996.)

3.3 DNA:n pitoisuuden mittaaminen

DNA:n pitoisuus mitataan, jotta tiedetään sen määrä ja osataan sen avulla laimentaa DNA jatkokäsittelyä varten. DNA:n pitoisuuden määrittämiseen on useita erilaisia keinoja. (Suominen & Ollikka 1997, 67–68.) Mittaus voidaan toteuttaa ultraviolettia absorbanssi spektrofotometrillä. DNA liuokseen absorboituneen eli imeytyneen UV-säteilyn määrä on suoraan verrannollinen näytteen DNA:n määrään. (Brown 1990, 34.) Yleisimmin käytetty DNA-mittausmenetelmä perustuu DNA:n nukleotidien absorptioon 260 nm:ssä. DNA-liuoksen absorbanssi 260 nm:ssä on 1,0 ja se vastaa DNA-konsetraatiota 50 µg/ml. Mittausta on hankala tehdä steriilisti, joten usein DNA-liuos on käyttökelvotonta mittauksen jälkeen.

Etuna menetelmälle on se, että se on vaivaton sekä sillä saadaan arvio DNA:n määrästä. (Suominen & Ollikka 1997, 67–68.)

DNA:n puhtaudesta saadaan arvio vertaamalla DNA:n ja proteiinien absorptioita keskenään. Proteiinien absorptiomaksimi on noin 280 nm:ssä. Puhtaalle DNA:lle absorbanssien suhde on $A^{260\text{nm}}/A^{280\text{nm}} = 1,8$. Proteiinit absorboivat voimakkaammin 280 nm:ssä, joten niiden läsnäolo DNA-liuoksessa alentaa absorbanssien suhdetta. (Suominen & Ollikka 1997, 67–68.) Näin ollen, jos absorbanssien suhde on vähemmän kuin 1,8, on liuoksessa todennäköisesti proteiinikontaminaatio (Brown 1990, 34).

3.4 PCR- monistaminen

PCR (polymerase chain reaction) on menetelmä, jonka avulla voidaan tietyn pituista DNA jaksoa monistaa miljooniksi kopioiksi. Ideana on tuottaa pienestä lähtömateriaalista suuri määrä lopputuotetta. Monistuksen jälkeen tutkimusta voidaan jatkaa muilla DNA:n analyysimenetelmillä, kuten agarosigeelielektroforeesilla tai hybridisaatiotekniikalla. PCR-tekniikka on siitä erinomainen, että kestää vain noin 3 tuntia, jotta saadaan monistetuksi haluttu geenijakso. Klassisilla geenitekniikan menetelmillä se veisi jopa viikon tai useamman. PCR on yksinkertainen ja halpa menetelmä, ja sen voi suorittaa yhdessä ainoassa putkessa minimaalisilla osatekijöillä, jotka kompensoituvat keskenään. (Dawson ym. 1996, 93–94.) PCR-sovellusten määrä on nykyään suuri ja niistä on apua moniin tutkimuksiin (Coen 2006).

PCR on nopea entsymaattinen menetelmä, johon tarvittavia ainesosia ovat kaksijuosteinen monistettava DNA, yksijuosteiset oligonukleotidialukkeet, DNA-polymeraasientsyymi, DNA:n trifosfaatinukleotidit (dNTPs), puskuri sekä suolat. Nämä sekoitetaan yhtenäiseksi seokseksi. (Coen 2006.) Koko monistusprosessin aikana ei seokseen ole enää tarvetta lisätä muita ainesosia (Nadder & Langley 2001, 255). Alukkeet ovat tarkoituksenmukaisia nukleotidien muodostamia lyhyitä juosteita, joiden emäsjärjestys on aina tunnettu. Vain valitsemalla oikeat alukkeet haluttuun tutkimuskohteeseen voidaan olla varmoja oikean DNA-juosteen monistumisesta. DNA-polymeraasin tehtävänä on katalysoida ja val-

voa saapuvien nukleotidien kykyä sitoutua emäspareiksi (adeniini-tyymiini ja guaniini-sytosiini). (Watson, Baker, Bell, Gann, Levine & Losick 2008, 751; Coen 2006.)

Monistaminen koostuu kolmen eri lämpötilan vaihteluista. Kun tämä kolmen eri lämpötilan vaihtelu tapahtuu kerran, kutsutaan sitä sykliksi. Normaalisti PCR-monistus sisältää noin 30 sykliä. Ensiksi monistettava DNA denaturoidaan 95 °C:ssa, jolloin kaksijuosteinen DNA avautuu yksijuosteisiksi kappaleiksi. Tämän jälkeen seos jäädytetään 40–45 °C:seen, jolloin alukkeet pääsevät hybridisointumaan eli liittymään emäspariperiaatteen mukaisesti vastakkaisiin DNA-juosteisiin. Tätä kutsutaan annealing-vaiheeksi. Seuraavaksi lämpötila nostetaan 72 °C:seen, jolloin molemmille DNA-ketjuille alkaa muodostua komplementaarinen juoste trifosfaattinukleotideista DNA-polymeraasin ansioista. Tätä kutsutaan synteesi-vaiheeksi. Parin minuutin kuluttua lämpötila nostetaan jälleen 95 °C:seen, jolloin myös vasta syntetisoitu DNA denaturoituu. Alukkeet pystyvät sitoutumaan myös näihin uusiin juosteisiin. (Orpana & Huoponen 2006, 272.)

Reaktioseokseen lisätään alukkeita huomattavasti enemmän verrattuna monistettavaan DNA:han. Alukkeet hybridisoituvat vastakkaisiin DNA-juosteisiin ja suuntautuvat siten, että niiden 3'-päätt ovat kohti toisiaan. Näin polymeraasientsyymi, joka katalysoi uusien juosteiden kasvua 5'-päästä 3'-pään suuntaan, ulottuu DNA-juosteissa alukkeiden yli. (Coen 2006.)

Ensimmäinen sykli päättyy uusiin, pituudeltaan epämääräisiin tuotteisiin, jotka voivat alkuperäisten juosteiden lisäksi hybridisoitua alukkeisiin denaturaation ja annealing-vaiheen aikana. Alkuperäiset tuotteet lisääntyvät vain aritmeettisesti jokaisen seuraavan denaturaation, annealing- ja synteesi-vaiheen aikana. (Coen 2006.)

Toisen syklin denaturaatio, annealing ja synteesi tuottavat kaksi yksijuosteista tuotetta, jotka ovat keskenään täsmälleen alukkeiden välissä olevien alueiden mittaisia. Jokainen tämän tuotteen juoste on komplementaarinen yhdelle kahdesta alukkeesta, ja voivat siten toimia templaattina, lähtömateriaalina, myöhemmissä sykleissä. Tästä eteenpäin tuotteen määrä kertautuu aina. Tuottei-

den kasvu on eksponentiaalista, siten että 30 sykliä saa aikaan 2^{28} tuotetta. (Coen 2006.)

3.5 DNA:n erottelu elektroforeesilla

PCR-monistamisen jälkeen DNA erotellaan ja tunnistetaan elektroforeesilla. Elektroforeesi perustuu siihen, että sähköiset voimat kuljettavat molekyylejä niiden varauksen mukaan. Positiivisesti varautuneet molekyylit (kationit) liikkuvat negatiivista napaa eli katodia kohti, ja negatiivisesti varautuneet molekyylit (anionit) liikkuvat positiivista napaa eli anodia kohti. Elektroforeesissa jännite antaa liikevoiman varautuneille molekyyleille sähkökentässä. Jännite jaettuna matkalla kahden elektrodin välillä antaa sähkökentän voiman, jota on yleisesti mitattu voltia/cm. Elektroforeesiajo tapahtuu johtavassa aineessa, puskuriliuoksessa, jossa sähkövirta kulkee. Puskuriliuos sisältää paljon positiivisia ja negatiivisia ioneja. (Martin 1996, 2-10.)

Geielektroforeesi on tärkeimpiä molekyylibiologisia menetelmiä nukleiinihappojen, kuten DNA:n, erottelussa. Nukleiinihappoelektroforeeseja on erilaisia ja menetelmä pitääkin valita sen mukaan mitä halutaan tutkia. Nukleiinihapot ovat negatiivisesti varautuneita molekyylejä, joten sähköisessä kentässä ne suuntaavat kohti positiivista elektrodia. Mitä suurempi jännite, sitä nopeammin ne kulkevat. Väliaine eli geeli ja nukleiinihappojen muoto vaikuttavat etenemiseen. Kun annetaan nukleiinihappojen kulkea vapaasti geelissä, voidaan ne erotella koon mukaan. Tämä johtuu siitä, että erikokoiset nukleiinihapot kulkevat eri nopeudella. (Martin 1996, 2-3.)

Nukleiinihappo koostuu emäksistä, sokereista ja fosfaateista. Nämä komponentit antavat nukleiinihapolle sen ominaisuudet, joita tutkitaankin elektroforeesilla. Nukleiinihapon kaksi ominaisuutta ovat perustana niiden käyttäytymiselle elektroforeesissa. Ensimmäisenä nukleiinihapot ovat happoja, koska fosfaattiryhmä luovuttaa H^+ -ionin hyvin herkästi. Tämän vuoksi DNA on negatiivisesti varautunut monissa puskureissa ja siksi se kulkee kohti positiivista elektrodia. Toinen ominaisuus nukleiinihappojen rakenteessa, joka vaikuttaa geielektroforeesiin, on luontainen emästen pariutuminen. Mitä suurempi jatkuvuus homologisessa

eli yhdenmukaisessa sarjassa on, sitä vakaampi on rakenne. Tämän vuoksi kaksijuosteinen molekyyli pysyy kaksijuosteisena molekyylinä. (Martin 1996, 2-3.)

Nukleiinihapot erottuvat koon mukaan, koska niillä kaikilla on sama varaus. Nukleiinihappomolekyylien elektroforeesissa käytetään väliaineena yleisimmin joko agarooosi-, polyakryyliamidigeeliä tai niiden sekoitusta. (Brown 2005, 18.) Molekyylien täytyy kulkea geelihuokosten läpi ja näin ollen geeli toimiikin kuin siivilä. Koska kaikilla molekyyleillä on sama varaus- ja kokosuhte, ne kaikki liikkuvat samalla nopeudella. Kuitenkin, pienimmät osat törmäilevät harvemmin tukiaineen kanssa, joten ne menevät geelin läpi nopeammin. Mitä isompi molekyyli, sitä voimakkaampaa on hidastuminen. Kun geelijaio on suoritettu, voidaan ne erotella koon mukaan, koska erikokoiset DNA-fragmentit ovat liikkuneet eripituisen matkan geelillä. (Martin 1996, 12–13; Watson ym. 2008, 741.)

Agaroosigeelielektroforeesi. Agaroosigeelielektroforeesi on yksinkertainen ja toimiva menetelmä erottamaan ja identifioimaan keskisuuria DNA-jaksoja, jotka sisältävät muutamasta sadasta muutamaan kymmeneen tuhanteen nukleotidiparia (Suominen & Ollikka 1997, 72; Voytas 2000). Agaroosigeelielektroforeesi koostuu neljästä eri vaiheesta, 1) geelin valmistuksesta agarooosista, 2) DNA-näytteiden pipetoimisesta näytekaivoihin, 3) elektroforeesiajosta sekä 4) visualisoinnista UV-valon avulla. (Voytas 2000.)

Agaroosielektroforeesissa käytettävä laite koostuu ajoaltaasta, altaan molemmissa päissä olevista elektrodeista ja turvakannesta. Agaroosigeelielektroforeesi tehdään vaakatasossa niin, että geelialustalle valettu geeli on kokonaan upotettu ajopuskuriin. Geeli valmistetaan mittaamalla haluttu määrä agarooosia Erlenmeyer pulloon ja siihen lisätään geelipuskuri sekä vesi. Seosta kiehautetaan useaan kertaan (3-5 kertaa) mikroaaltouunissa tai autoklaavissa, kunnes kaikki agarooosi on liennut. Kun seos on jäähtynyt, siihen lisätään etidiumbromidia, joka värjää geelin. Geeliä sekoitetaan varovasti, jotta siihen ei synny ilmakuplia. Sula agaroosigeeli kaadetaan geelialustalle, jonka päät on suljettu. (Suominen & Ollikka 1997, 73.) Geeliin asetetaan geelikampa, samalla huolehtien, ettei sen alle jää ilmakuplia. Geelikampa muodostaa näytekaivot, joiden tilavuus riippuu

sekä geelin paksuudesta että geelikamman koosta. (Voytas 2000.) Geelin valamisen jälkeen, sen annetaan jäähtyä ja jähmettyä noin 15–30 minuuttia. Geelin jähmettyttyä alustan päädyt ja kampa poistetaan, ja geeli asetetaan ajoaltaaseen. Ajoallas täytetään ajopuskurilla siten, että agarosigeeli peittyy kokonaan. Ajopuskuri on samaa kuin geelin valmistuksessa käytetty puskuri. (Suominen & Ollikka 1997, 73.)

Ennen ajon aloittamista on valmistettava näytteet. Näytteenä on PCR-monistuksesta saatu DNA-materiaali. Näytteisiin tulee lisätä loading-puskuria, jotta näyte on ajopuskuria painavampaa ja asettuu näin ollen näytekaivojen pohjalle. Loading-puskuri saattaa jo itsessään sisältää väriainetta esim. bromifenolisinistä (BPB), joka auttaa seuraamaan ajon edistymistä. Loading-puskuria voidaan lisätä näytteeseen vain 1/5-1/10 tilavuutta, jotta geelille pipetoitavan näytteen tilavuus ei kasva liian suureksi. Näytteet pipetoidaan geelille vierekkäin oleviin näytekaivoihin varovasti mikropipetillä. Ensimmäiseen ja viimeiseen kaivoon pipetoidaan kokostandardi. Kokostandardin, jonka fragmenttien koot tunnetaan, idea on siinä, että sen avulla saadaan tutkittavan DNA:n koosta arvio. Usein käytetään λ -DNA:ta, joka on pilkottu jollakin entsyymillä tunnetun kokoisiksi fragmenteiksi. Yleisiä ovat mm. Hind III, BstE II tai sekä EcoR I että Hind III katkaistu λ -DNA-digestit. Kokostandardiseoksia on saatavana myös kaupallisesti. (Suominen & Ollikka 1997, 73–74.)

Ajo aloitetaan asettamalla turvakansi ajolaitteen päälle, kytkemällä johtimet virtalähteeseen ja kytkemällä ajo päälle. Tavallisessa agarosigeelielektroforeesissa käytetään 20–200 V jännitettä riippuen ajolaitteesta ja geelin koosta. Virta kuljettaa DNA-näytteitä anodille DNA-jaksojen koon määrittämällä nopeudella. Kun väriaine on kulkeutunut riittävän pitkälle, sammutetaan virtalähde, avataan kansi ja nostetaan geeli varovasti ajoaltaasta. (Suominen & Ollikka 1997, 73.)

Geelielektroforeesin tulosten visualisointi ja tulkinta. Kun nukleiinihappojen erottelu elektroforeesilla on suoritettu, täytyy DNA vielä tunnistaa ja tallentaa (Martin 1996, 49–50). DNA ei sellaisenaan näy agarosigeelissä, joten geeli tulee värjätä fluoresoivalla aineella, kuten etidiumbromidilla. Etidiumbromidin voi laittaa geeliin, joko sitä valettaessa (kts. Agarosigeelielektroforeesi) tai värjää-

mällä geeli ajon jälkeen. Jos värjäys tehdään ajon jälkeen, geeli upotetaan 10–30 minuutiksi laimeaan etidiumbromidiliuokseen ennen sen tarkastelua UV-valossa. Etidiumioni sitoutuu nukleiinihappojen emästen väliin. Kun DNA-etidiumkompleksia säteilytetään ultraviolettivalolla, emäkset absorboivat UV-säteitä ja luovuttavat saamansa energian etidiumbromidille, joka fluoresoi oranssinpunaisena vyöhykkeenä. Jokainen vyöhyke paljastaa tietyn kokoisen DNA-molekyylin olemassaolon. Etidiumbromidi on karsinogeeni, joten sitä tulee käsitellä asianmukaisesti. Työskennellessä on syytä olla huolellinen, pidettävä asianmukaista suojavaatetusta sekä huolehtia etidiumbromidin oikeaoppisesta hävittämisestä. (Suominen & Ollikka 1997, 72–74; Watson ym. 2008, 741.)

Värjättyä geeliä tarkastellessa UV-valossa, DNA-vyöhykkeet näkyvät oranssinpunaisina etidiumbromidikomplekseina. Tavallisesti tarkasteluun käytetään alaspäin valaisevaa UV-valaisinta. UV-laitteen valo on voimakasta ja lyhytaaltoista, joten sitä käsiteltäessä on käytettävä suojalaseja. UV-valossa fluoresoivista DNA-vyöhykkeistä voidaan ottaa kuva. Vyöhykkeille on tyypillistä, että ne näkyvät paremmin, mitä enemmän niissä on DNA:ta. (Suominen & Ollikka 1997, 74–76.)

4 TYÖOHJE OPPIMATERIAALINA

4.1 Oppimateriaali ja sen tuottaminen

Oppimisympäristön käsite kuvaa menettelyiden ja toimintatapojen kokonaisuutta, jolla pyritään edistämään tarkoituksenmukaista oppimista (Lehtinen, Kuusinen & Vauras 2007, 249; Manninen, Burman, Koivunen, Kuittinen, Luukannel, Passi & Särkkä 2007, 15). Fyysinen oppimisympäristö, johon kuuluvat myös oppimateriaalit, on yksi oppimisympäristön osa-alue. Oppimateriaaliksi tarkoitettujen välineiden, tehtävien ja muun materiaalin merkitys on tukea oppimista muun opetuksen apuna. (Manninen ym. 2007, 127.) Oppimateriaali tarkoittaa oppiai-

nesta, joka on yleensä kytketty johonkin opetussisältöön. Tämä synnyttää oppikokemuksen kautta tavoitteiden mukaisia, pysyvien tietojen ja taitojen muunnoksia. (Jeronen 2005a, 183.) Oppimateriaalilla yksin ei kuitenkaan vielä ole ratkaisevaa merkitystä oppimiselle. Näin ollen oppiminen on riippuvainen myös opettajan, ohjaajan ja oppilaan taidoista nähdä oppimateriaalin mahdollisuudet toimia oppimisen apuna. (Manninen ym. 2007, 129; Ewles & Simnett 1995, 229.) Oppimateriaalin valitseminen ja valmistaminen liittyy olennaisesti oppimistavoitteisiin. Valittujen materiaalien tehtävänä on palvella opetusstrategioita sekä tukea opiskelua ja oppimista. (Jeronen 2005b, 198.) Opetustarkoitukseen tuotetut oppimateriaalit heijastelevat myös aikaansa sekä tekijöidensä tieto- ja oppimiskäsityksiä (Manninen ym. 2007, 127).

Työohje on yksi tyypillinen opetukseen käytetty oppimateriaali. Sen tarkoitus on kuvata tietyn toiminnon yksittäiset työvaiheet. (Jeronen 2005b, 201; Tervonen 2004.) Työohjeiden muodossa oleva tehtävä on yleensä suljettu, mikä tarkoittaa, että jokaiselle työvaiheelle on annettu ohjeet, joita tulee noudattaa. Myös tutkimuskohteet ja menetelmät ovat ennalta määrättyjä. Työohjeita noudattamalla pyritään pääsemään aina samaan lopputulokseen ja saatujen tulosten pohjalta voidaan tehdä johtopäätöksiä. Työvaiheiden tarkka kirjaaminen on erityisen tärkeää, jotta työn onnistumista voidaan lopussa arvioida. (Palmberg 2005, 121.)

Työohjeiden niin kuin muunkin oppimateriaalin suunnittelussa, valmistamisessa sekä käytössä tulee ottaa huomioon monia asioita. Ensimmäinen asia, josta oppimateriaalin luominen tulee aloittaa, on miettiä ketä varten ne tehdään. (Jeronen 2005b, 198; 200.) Tämän vuoksi on tärkeää määrittää kohderyhmä ja kysyä heiltä, millaiselle materiaalille he kokevat olevan tarvetta (Ewles & Simnett 1995, 227). Materiaali on hyvä myös esiteltävä kohderyhmällä ennen tuotantoprosessin loppumista (Ewles & Simnett 1995, 233–234). Viestintävälinettä valittaessa tulee miettiä, mikä on oikea menetelmä saada opetettava asia menemään perille tehokkaasti ja ymmärrettävästi (Ikävalko 1994, 25–26). Viestintävälineen valintaan vaikuttaa myös oppimateriaalin käyttötarkoitus sekä kohderyhmän toiveet (Ewles & Simnett 1995, 227; Parkkunen, Vertio & Koskinen-Ollonqvist 2001, 8). Yksityiskohtia suunniteltaessa on mietittävä, mikä on opiskeltava aihe ja mitä taitoja kohderyhmän tulisi oppia (Jeronen 2005b, 200). Aineiston tuotantoprosessin

huolellinen suunnittelu helpottaa prosessin hallintaa. Suunnittelussa tulee ottaa huomioon, kuka kirjoittaa ja kuka tarkastaa oppimateriaalin. Tärkeää on myös miettiä, testaako kohderyhmä materiaalia ja jos testaa, niin miten. (Ewles & Simnett 1995, 233–234; Parkkunen ym. 2001, 9.)

4.2 Oppimateriaalin suunnittelun ja laadun arvioinnin kriteerit

Arvioinnilla on tarkoitus kehittää oppimateriaalin laatua. Johdonmukaisen arvioinnin avuksi tarvitaan kriteereitä, joihin arviointi perustuu. Oppimateriaalia arvioidessa laatukriteerit voidaan jakaa sen mukaan, liittyvätkö ne sisältöön, kieliasuun, ulkoasuun vai kokonaisuuteen. Tällaisen ryhmittelyn avulla niitä on helppo hyödyntää oppimateriaalin arvioinnissa sekä suunnittelussa. Hyvän oppimateriaalin luominen edellyttää näiden kaikkien kriteereiden täyttymistä. (Parkkunen ym. 2001, 9-10.) Tavoitteena näillä kriteereillä on yhdessä saada oppimateriaalista mahdollisimman havainnollistava ja helposti ymmärrettävä (Jeronen 2005b, 199).

Sisältö. Oppimateriaalin sisältö on erittäin tärkeää suunnitella tarkkaan, koska se on opetettavan asian perusta. Oppimateriaalille tulee alussa määritellä tavoite. Tavoitteen tehtävä on ohjata sisällön muodostumista ja tarkentaa sitä. Tavoite kertoo lukijalle, mihin aineistolla pyritään ja mitä tapahtuu, kun hän perehtyy materiaaliin. Myös sisällön suunnittelu helpottuu tavoitteen ollessa selkeä, sillä oppimateriaalin sisältöä voidaan rajata sen avulla. (Parkkunen ym. 2001, 11–12.)

Sisältöä luotaessa tulee ottaa huomioon, että sisältö on asiaankuuluvaa, virheetöntä ja ajanmukaista (Jeronen 2005b, 199; Parkkunen ym. 2001, 12). Materiaalin käyttäjän täytyy voida luottaa, että materiaalin sisältävä tieto perustuu tutkittuun tietoon. Yksi olennainen keino on merkitä materiaaliin lähteet, josta tiedon alkuperä näkyy. Ajankohtaisuudesta puolestaan kertovat lähdeaineiston julkaisuvuodet. Kokemuksellinen tieto kuitenkin vahvistaa materiaalista saadun tiedon oppimista. Tärkeää on, että materiaalin tekijöiden perehtyneisyys kyseiseen asiaan näkyy. (Parkkunen ym. 2001, 12.)

Sisällössä tulee myös ottaa huomioon, kuinka sen on tarkoitus tukea kohderyhmän taitojen kehittymistä (Jeronen 2005b, 199). Täytyy miettiä, onko tarkoitus, että materiaali antaa mahdollisimman kattavaa tietoa aiheesta vai ainoastaan keskeiset asiat. Sisällön rakentuminen riippuu siis materiaalille asetetuista tavoitteista. (Parkkunen ym. 2001, 12.) Materiaalissa on kuitenkin tärkeintä tarjota se tieto, mikä kohderyhmälle on olennaisinta ja jättää asiaankuulumaton pois (Ewles & Simnett 1995, 234).

Ulkoasu. Ainoastaan hyvän sisällön luominen ei riitä luomaan hyvää oppimateriaalia. Se tarvitsee tuekseen ulkoasun, jolla voidaan vaikuttaa sisällön asettuun ja näin ollen materiaalin selkeyteen. (Parkkunen ym. 2001, 15.) Oppimateriaalin ulkoasuun saa hyviä vinkkejä selkokielen oppaista, vaikka tarkoituksena ei olisikaan kirjoittaa selkokieltä. Selkokielen oppaat sisältävät helpon kielen periaatteet, joita voi käyttää suunniteltaessa oppimateriaalin ulkoasua helpottamaan tekstin lukua. On pyrittävä välttämään pientä fonttikokoa ja epäselvää fonttityyppiä. Tekstin sijoittelu paperille, rivivälit, merkit ja numerot tulee olla myös hyvin suunniteltuja, jotta lopputulos ilmava. (Itkonen 2005, 72–86; Rajala 1990, 36.) Harkituilla tekstityypin ja -koon valinnoilla voidaan vaikuttaa aineiston tunnelmaan sekä käyttökelpoisuuteen (Parkkunen ym. 2001, 15).

Otsikoinnilla ja kappalejaolla saadaan parannettua tekstin luettavuutta, ja ne myös osaltaan vaikuttavat materiaalin selkeyteen (Parkkunen ym. 2001, 16). Pääotsikon tehtävä on kertoa tärkein asia, mitä ohjeessa käsitellään. Väliotsikot puolestaan kertovat millaisista asioista kappaleet koostuvat. (Hyvärinen 2005, 1770.) Tekstistä, joka on sijoitettu väljästi, on helpompi havaita käsiteltävän asian pääkohdat ja hahmottaa keskeinen sisältö (Parkkunen ym. 2001, 16). Visuaaliseen vaikuttavuuteen vaikuttaa myös se, että aiheen pääkohdat asetellaan sivun keskelle (Ewles & Simnett 1995, 234). Tekstin tasaamista käytettäessä suositellaan käytettävän myös tavutusta, koska muuten sanavälit jäävät eripituisiksi (Parkkunen ym. 2001, 16). Myös palstan leveys ja kappaleiden pituus, tehostukset ja otsikot vaikuttavat materiaalin selkeyteen (Wiio & Puska 1993, 66–67). Normaalin tekstin rivin pituudelle on myös määritelty pituus tietyin kriteerein. Suositus on, että yhdellä rivillä tulisi olla alle 65 merkkiä eli noin kahdeksan sanaa. Materiaalin luettavuuden helpottamiseksi tekstin ja taustan kontrastin tulee

olla hyvä. Yksi suositeltavista väriyhdistelmistä hyvän kontrastin luomiseksi on musta teksti valkealla pohjalla. Materiaalin suunnittelussa asioita on katsottava monesta eri näkökulmasta ja tehtävä kompromisseja niin, että materiaalin kustannukset eivät kasva liian suuriksi, mutta se säilyttää kuitenkin selkeytensä. (Parkkunen ym. 2001, 16.)

Olennaisten pääkohtien korostaminen on hyvä tapa saada keskeinen sisältö erottumaan muusta tekstistä. Pääkohtia voi korostaa esimerkiksi kirjasinkokoa tai -tyyliä muuttamalla. Myös värien käyttö on hyvä keino korostamiseen. (Ewles & Simnett 1995, 234.) Suosituin keino on kuitenkin käyttää lihavointia (Parkkunen ym. 2001, 17).

Ulkoasua valmistettaessa materiaalin selkeä järjestely on olennaisessa asemassa. Erityisesti kuvien ja tekstin suhde ja asettelu on hyvä miettiä tarkkaan. Esimerkiksi aineiston sisältäessä useita kuvia on ne hyvä sijoittaa aina samaan kohtaan materiaalia (Parkkunen ym. 2001, 18). Molempien, sekä tekstin että kuvien tulee olla selkeitä ja toisiaan tukevia (Jeronen 2005b, 199). Kuvan ja tekstin yhdistäminen helpottaa asian muistamista ja parantaa vaikuttavuutta. Kuvitus vaikuttaa myös materiaalin kiinnostavuuteen herättämällä mielenkiintoa. Toisaalta kuvat toimivat myös ymmärtämisen apuna. Asioita, joita on vaikea selittää, voi selkeyttää kuvien avulla, koska ne välittävät tietoa nopeammin kuin teksti. (Parkkunen ym. 2001, 17.)

Kieliasu. Oppimateriaali, joka tehdään englanninkielellä opiskelijoille, joiden äidinkieli ei ole englanti, tulee erityisesti olla kieliopillisesti selkeää, helppolukuista ja havainnollista (Itkonen 2005, 72–86; Rajala 1990, 36). Tekstissä on noudatettava oikeinkirjoituksen sääntöjä, sillä virheet hankaloittavat ymmärtämistä (Hyvärinen 2005, 1772). Materiaalin luettavuuden tason soveltuvuutta tulisikin testata kohderyhmällä, jotta päästäisiin selvyyteen siitä, vastaako se kohderyhmän lukutaitoa (Parkkunen ym. 2001, 13).

Lauserakenteet ja käsitteiden käyttö tulee miettiä tarkkaan. Lauseiden tulee esittää sisällön kannalta olennaiset asiat. Kuitenkin monimutkaisia lauserakenteita ja vaikeita käsitteitä tulisi välttää, koska ne heikentävät tekstin luettavuutta (Ew-

les & Simnett 1995, 235; Wiio & Puska 1993, 64). Pitkät ja monimutkaiset lauseet ylikuormittavat pikamuistia, johon mahtuu kerrallaan vain 5-10 sanaa. Aivojen on kuitenkin todettu käsittelevän kahta pikamuistillista kerrallaan, mikä tarkoittaa noin 15–20 sanaa. Jos lauseen pituus ylittää tämän, lauseen ymmärrettävyys laskee nopeasti. (Wiio & Puska 1993, 64.) Näin ollen pitkien lauseiden sijasta tulisikin suosia lyhyitä informatiivisia lauseita, jotka kiinnittävät paremmin lukijan huomion. Tuttujen käsitteiden käyttö vieraiden sijasta olisi myös kannattavampaa. Tutut käsitteet helpottavat asioiden ymmärtämistä, asiayhteyksien muodostamista ja asioiden muistamista. (Parkkunen ym. 2001, 14.) Myös turha lyhenteiden käyttö voi tehdä tutunkin asian vieraaksi ja näin ollen heikentää lukijan motivaatiota (Hyvärinen 2005, 1771).

Kokonaisuus. Oppimateriaalin kokonaisuus vaikuttaa siihen, millaisia reaktioita se saa vastaanottajassa aikaan. Vaikka kaikki aiemmin mainitut kriteerit täyttyisivät oppimateriaalissa, mutta sisältö on esitetty epäloogisesti, voi se pilata lopputuloksen. (Parkkunen ym. 2001, 21.) Kohderyhmän sitoutumisella oppimateriaaliin on suuri merkitys kohderyhmän oppimisen kannalta. Tämän takia on tärkeää, että oppimateriaali tukee opiskelijoita käyttämään niitä aktiivisesti ja omatoimisesti. (Jeronen 2005b, 199.)

Yksi aineiston vaikuttavuuden edellytys on sen sopivuus vastaanottajalle (Parkkunen ym. 2001, 18). Oppimateriaalia tulee miettiä siltä kannalta, että se on kohderyhmän kykytasoon sopiva (Jeronen 2005b, 199). Se ei saa ali- tai yliarvioida kohderyhmäläisiä. Erittäin tärkeää on myös huomioida kohderyhmän kulttuuri. Kohderyhmän kartoituksen lisäksi aineistoa suunniteltaessa on kannattavaa tehdä kartoitusta heidän tiedoistaan, taidoistaan ja asenteistaan. Nämä tiedot helpottavat muokkaamaan aineistoa kohderyhmälle sopivaksi heidän kulttuuriaan kunnioittaen. Esitestauksen avulla saadaan tietoa materiaalin soveltuvuudesta kohderyhmälle. Esitestaus tulee toteuttaa kohderyhmällä mielellään siinä ympäristössä, jossa aineistoa tullaan käyttämään. Esitestauksen hyödynnettävyys on sitä parempi mitä varhaisemmassa vaiheessa prosessia se saadaan toteutettua. Myöhemmässä vaiheessa toteutettu testaus kertoo enemmän siitä, kuinka lopulliseen tuotokseen tullaan suhtautumaan. (Parkkunen ym. 2001, 19.)

4.3 Kuvat osana oppimateriaalia

Sanattomaan viestintään nimensä mukaisesti kuuluu kaikki sellainen viestintä, jossa ei käytetä sanoja (Ewles & Simnett 1995, 127). Se voi useissa tilanteissa ratkaista, onnistuuko viestintä vai ei. Sanattomaan viestintään lasketaan myös kuvien käyttö. (Wiio & Puska 1993, 33 & 52.) Kuvat ovat myös tärkeitä apuvälineitä luotaessa oppimateriaaleja. Ne auttavat havainnollistamaan asioita, ja niiden tehtäviin kuuluvat tarkkaavaisuuden suuntaaminen, muistamisen helpottaminen sekä ymmärtämisen edistäminen. (Jeronen 2005b, 208.)

Opetuskuvien valinnassa kannattaa hyödyntää erilaisia näkökulmia, jotta ne tukisivat mahdollisimman monenlaisten tietojen ja taitojen kehittymistä. Kuvien tarkastelu kannattaa aloittaa miettimällä kuvan sisältöä ja sen tapahtumia. Tämän kautta voi esimerkiksi miettiä, mitä sellaista kuvasta puuttuu, mitä siinä voisi olla. Kuvissa ei kannata olla liikaa yksityiskohtia, mutta niiden tulee kuitenkin kertoa olennainen asia. Kuvia valittaessa on hyvä pitää mielessä, kenelle kuvat on suunnattu. Mitä mielenkiintoista kuvassa on, sekä mitä tuttua tai vierasta se mahdollisesti sisältää kohderyhmän näkökulmasta? Vaikka kuva onkin hyvä havainnollistamisen väline, se kertoo kuitenkin vain siitä hetkestä, kun kuva otetaan. Tämän takia on hyvä miettiä, mitä on tapahtunut ennen kuvaamishetkeä ja mitä tapahtuu sen jälkeen. On myös hyvä miettiä, millaisia tunteita kuvat herättävät ja edustavatko ne jotain arvoja tai asenteita. Kuvissa on paljon sisäisiä merkityksiä, jotka voivat joskus johtaa väärin tulkintoihin. (Jeronen 2005b, 208–212.)

Oppimateriaalissa jokainen kuva tulisi jollain tavalla olla liitettyä tekstiin (Jeronen 2005b, 202). Tämä yleensä hoidetaan täydentämällä kuvaa kuvatekstillä, jonka tarkoitus on kertoa jotain sellaista, mitä kuva ei itsessään kerro. Kuvatekstin tehtävä on kertoa, miksi kuva on opittavan asian yhteydessä ja miksi siihen on valittu juuri ne elementit mitkä kuvassa esiintyvät. Kuvan ja kuvatekstin yhdistelmän tehtävä on myös herättää huomiota, joten tätä hyödyntämällä saadaan tärkeä asia nostettua selkeästi esille. Kuvatekstiin on hyvä tiivistää asioita kuitenkin pitäen mielessä, että olennainen asia välittyy kuvasta. (Ikävalko 1994, 279.)

5 KEHITTÄMISTYÖN TEHTÄVÄT

Tämä kehittämistyö koostui neljästä tehtävästä, jotka muodostivat lopullisen työohjeen. Ensimmäisenä tehtävänä oli kerätä tietoa molekyylibiologian ja geenitekniologian julkaisuista. Toisena tehtävänä oli laatia työohje kerätyn tiedon ja kohderyhmän tarpeiden pohjalta. Lisäksi työohjeen sisältö, ulkoasu, kieliasu ja kokonaisuus laadittiin hyvän oppimateriaalin kriteereiden perusteella (kts. 4.2 Oppimateriaalin suunnittelun ja laadun arvioinnin kriteerit). Tämän työohjeen runkona toimi Savonia-ammattikorkeakoulussa käytetty työohje. Kolmantena tehtävänä työohjeen toimivuus testattiin käytännössä koulun laboratoriotiloissa ja samalla otettiin kuvia menetelmien työvaiheista. Viimeisenä tehtävänä oli arviointi. Kohderyhmää ja alan ammattilaista pyydettiin arvioimaan työohje kirjallisuudesta saatujen kriteerien mukaan. Saadun palautteen perusteella tehtiin työohjeeseen tarvittavat muutokset. Nämä tehtävät läpikäymällä laadittiin lopullinen työohje DNA:n tutkimusmenetelmistä.

6 KEHITTÄMISTYÖN TOTEUTUS

6.1 Tiedon kerääminen

Tiedonhaussa käytettiin seuraavia tietokantoja: Aapeli, Helka, Josku, Linda, Medici, Nelli ja PubMed. Käytetty lähdemateriaali oli pääasiassa tietokirjallisuutta. Kotimaisia ja ulkomaisia tutkimuksia ja artikkeleita hyödynnettiin melko vähän, koska ne vastasivat huonosti aihetta. Tämä osaltaan heikentää lähdemateriaalin monipuolisuutta. Hakusanoina käytettiin sekä suomen- että englanninkielisiä sanoja: DNA, human DNA purification/isolation, DNA:n eristäminen, PCR, polymerase chain reaction, DNA-tutkimusmenetelmät, oppimateriaali, oppimisympäristö, oppiaines, teaching material, electrophoresis.

6.2 Työohjeen laatiminen

Kohderyhmä. Ewlesin ja Simnetin (1995, 227) mukaan kohderyhmän määrittäminen helpottaa suunnitellun materiaalin luomista. Tämän työohjeen kohderyhmänä on ensisijaisesti Instituto Superior de Ciências de Saúde (Maputo, Mosambik). Pääasiallisia hyödynsajia ovat ISCISA:n bioanalytiikan opiskelijat ja opettajat. He voivat hyödyntää tuotettua materiaalia molekyylibiologian ja geeniteknologian harjoituskokonaisuudessa. Kohderyhmän yhteyshenkilöinä toimivat laboratorioalan opettajat Adelino Manuel ja Tomás Zimba. Toissijaisia hyödynsajia ovat Savonia-ammattikorkeakoulun opiskelijat ja erityisesti vaihto-opiskelijat.

Kohderyhmän tarpeiden kartoitus ja huomioiminen. Kohderyhmän tarpeiden kartoitus lähti liikkeelle kysymällä kohderyhmän yhteyshenkilöltä Adelino Manuelilta (2008), millaiselle materiaalille heillä on tarvetta. Sisällöllisenä toiveena oli, että oppimateriaalin tulisi sisältää PCR-tekniikkaa.

Työohjeen laadinnassa huomioitiin kohderyhmän siten, että heidän on helppo soveltaa työohjetta oman tarpeensa mukaan. Työohje sisältää DNA:n eristämisen sekä kaupallisella kitillä, joka sisältää valmiit eristysliuokset, että itse tehdyillä liuoksilla. Näin ollen kohderyhmä voi valita menetelmän oman taloudellisen tilanteensa ja reagenssien saatavuuden mukaan. Esimerkiksi PCR-seoksen määrä ilmoitetaan yhtä näytettä kohden, koska riippuen näytteiden määrästä, myös seoksen määrä muuttuu.

Huomiota kiinnitettiin myös tekstin selkeyteen, koska englanti ei ole kohderyhmän äidinkieli. Tarkoitus ei kuitenkaan ollut aliarvioida heidän osaamistaan, joten tekstin tuli olla ammattimaista sisältäen molekyylibiologisia termejä (vrt. Parkkunen ym. 2001, 19). Ammattikielen käyttö helpottaa myöhemmin myös lisätiedon etsimistä kansainvälisistä julkaisuista esim. Internetistä. Kuitenkin tutut käsitteet helpottavat asioiden ymmärtämistä, asiayhteyksien muodostamista ja asioiden muistamista (Parkkunen ym. 2001, 14). Kohderyhmältä pyrittiin saamaan palautetta myös työohjeen kieliasusta. Testaamalla työohjetta kohderyhmällä päästäisiin selville siitä, vastaako se kohderyhmän lukutaitoa (Park-

kunen ym. 2001, 13). Tekstin tueksi työohjeisiin lisättiin kuvia havainnollistamaan ja lisäämään ymmärrettävyyttä.

Sisällön laatiminen. Työohjeen rakenne koostuu käytettyjen DNA-tutkimusmenetelmien teoriasta, tarvittavien välineiden luetteloista, eri työvaiheista sekä niistä otetuista kuvista. Varsinaisten työohjeiden (kts. Liite 2.) yhteyteen laadittiin lisäksi yleiset työskentelyohjeet (kts. Liite 1.). Niiden tarkoitus oli kertoa, mitä asioita tulee ottaa huomioon, kun työskennellään DNA:n kanssa. Työohjeen sisältö laadittiin molekyylibiologian ja geeniteknologian teorian perusteella (kts. 2. DNA ja sen rakenne ja 3. DNA-tutkimusmenetelmät).

Työohjeeseen DNA-tutkimusmenetelmien rinnalle tarvittiin jokin identifikaatiotutkimuksen kohde. Tässä työohjeessa käytettiin tutkimuksen kohteena VNTR-alue (variable number tandem repeat). Tämän alueen käyttö opetuksessa on perusteltua, koska sillä ei ole diagnostista merkitystä. Suomisen ja Ollikan (1996) mukaan kyseinen VNTR-alue sijaitsee kromosomissa 1 ja on 16-emäsparin mittainen ja se voi toistua eri ihmisillä 15–41 kertaa. Tutkimuksessa voidaan arvioida VNTR-alueen kokoa vertaamalla sitä kokostandardiin (Suominen & Ollikka, 1996).

Ulko- ja kieliasun laatiminen. Ulkoasun ja kieliasun laadinnassa otettiin huomioon, millainen työohje on rakenteeltaan ja kieleltään. Paperin asettelussa päädyttiin vaakasuoraan kahden palstan asetteluun, koska tällöin rivin pituus pysyi riittävän lyhyenä eikä luettavuus kärsinyt. Vaakasuora asettelu helpotti myös kuvien asettelua työohjeeseen.

Työohjeessa käytettiin selkeää fonttityyppiä, Arialia. Fonttikooksi valittiin yhdeksän, koska se sopi vaakasuoraan asetteluun sekä rivin pituuteen ja riviväliin parhaiten. Onkin pyrittävä välttämään pientä fonttikokoa ja epäselvää fonttityyppiä. Lisäksi teksti, merkit ja numerot sijoitettiin paperille ilmeisesti (vrt. Itkonen 2005, 72–86; Rajala 1990, 36). Työohjeen otsikoinnilla ja loogisella etenemisellä yritettiin helpottaa sen luettavuutta ja näin ollen vaikuttaa sen selkeyteen.

Työohjetta testatessa otettiin valokuvia ja niitä pyrittiin saamaan kaikista eri työvaiheista. Kamerana käytettiin Samsungin P800 kameraa, jolla saa 8,2 megapikselin kuvia. Työohjeeseen valittiin informatiivisimmat kuvat, joilla on ainakin kaksi sisällöllistä merkitystä. Kuvien tulee kertoa vain olennainen asia, eikä niissä saa olla liikaa yksityiskohtia (vrt. Jeronen 2005, 208). Valitut kuvat käsiteltiin Adobe Photo Shop -kuvankäsittelyohjelmalla, jolla pystyttiin muuttamaan kuvien tiedostokokoa ja kirkkautta. Kuvia täydennettiin kuvateksteillä, koska kuvan tulee aina olla liitettyä tekstiin (vrt. Jeronen 2005, 202).

Tuotoksen muoto. Tuotos tehtiin Word-tiedostona, josta se on helppo myös tulostaa käyttöön. Viestintävälineen valintaan vaikutti työohjeen käyttötarkoitus, kohderyhmän toiveet (vrt. Ewles & Simnett 1995, 227; Parkkunen ym. 2001, 8) ja se, miten saadaan opetettava asia menemään perille mahdollisimman tehokkaasti ja ymmärrettävästi (vrt. Ikävalko 1994, 25–26). Työohjeen tarkoitus on olla käytännön harjoittelun ohjeistus, jolloin tulostettu työohje on sähköistä tiedostoa tehokkaampi. Sitä on helppo käyttää harjoittelun yhteydessä ja lisäksi siihen voi tarvittaessa tehdä omia merkintöjä.

6.3 Työohjeen testaaminen

Työohjeen testaus toteutettiin koulun laboratoriotiloissa. Tässä kuvaillaan testauksen etenemistä työohjeen mukaisesti sekä kaikki siihen liittyvät työvaiheet. Testauksen työvaiheet olivat DNA:n eristäminen, pitoisuuden mittaaminen, PCR-monistaminen, agaroosigeelielektroforeesi ja tulosten visualisointi. Työohjeen testaus kesti yhden työviikon ajan. Liuokset valmistettiin kahtena ensimmäisenä päivänä, samalla kun DNA-eristys aloitettiin tehdasvalmiilla kitillä. Kolmantena päivänä mitattiin eristetyn DNA:n pitoisuus sekä tehtiin PCR-monistus. Neljäntenä päivänä monistettu DNA ajettiin agaroosigeelille ja tulokset visualisoitiin. Viidentenä päivänä eristettiin DNA itse tehdyillä liuoksilla. Tästä saatua tuotetta ei jatkokäsitelty, koska eristäminen todettiin onnistuneeksi.

Ennen työskentelyn aloittamista tarvittavat laitteet kalibroitiin eli testattiin niiden luotettavuustaso. Kalibroimme yläkuppivaa'an niille suunnitelluilla punnuksilla ja arvioimme näin vaa'an tulostason tarkkuutta. Kalibroimme myös pH-mittarin sil-

le tarkoitetuilla sitraattipuskuriliuoksilla, joiden pH-arvot tiedetään. Kalibroinnin jälkeen pystyttiin etenemään luottavaisin mielin valmistettavien liuosten pH-arvojen määrittämiseen.

Liuosten valmistaminen. Ensin valmistettiin työssä käytettävät liuokset, koska DNA:n eristys tehtiin valmiiden kittiliuosten lisäksi itse tehdyillä liuoksilla. Valmistettavia liuoksia oli neljä: 5xProteinaasi-K-puskuriliuos, Proteinaasi-K-liuos, 20-prosenttinen SDS-liuos sekä Punasolujen lyysipuskuri. Kutakin liuosta valmistettiin huomioimalla tarvittavat liuosmäärät. Tarvittaessa pH-arvojen säätäminen tehtiin käyttämällä NaOH:a (natriumhydroksidi) ja HCl:a (suolahappo). Seuraavassa luetteloidaan liuosten ainesosat ja niiden pitoisuudet, jonka jälkeen liuosten valmistaminen selostetaan.

5xproteinaasi-K-puskurin valmistaminen (80µl/näyte)

- 0,375 M NaCl
- 0,12 M EDTA, pH 8,0

Ensin valmistettiin 0,5 M EDTA:ta. Kiinteä EDTA punnittiin ja liuotettiin veteen. Tämän jälkeen pH-arvo säädettiin kahdeksaan lisäämällä kiinteää NaOH:a. pH-arvoa säädettäessä on tärkeää samalla sekoittaa liuosta, koska EDTA jauhe liukenee kunnolla vasta pH-arvon ollessa lähellä kahdeksaa. 0,5 M EDTA laimennettiin 0,12 M EDTA:ksi. Tähän liuokseen lisättiin lopuksi kiinteä NaCl.

Punasolujen lyysipuskurin valmistaminen (1 ml /näyte)

- 0,32 M sakkaroosia
- 1-prosenttinen Triton x-100
- 5 mM MgCl₂
- 12 mM Tris-HCl, pH 7,5

Ensin valmistettiin 12 mM Tris. Kuten edellisen liuoksen valmistamisessa, jouduttiin tässäkin tasaamaan pH-arvo. Koska Tris on luonteeltaan voimakkaasti emäksinen, pH-arvon säätäminen 7,5:een tapahtui nyt puolestaan voimakkaalla

HCl:lla. Tris-HCl-liuokseen lisättiin nestemäinen Triton x-100. Lisäksi punnittiin sakkaroosi sekä MgCl_2 , jonka jälkeen ne liuotettiin kantaliuokseen.

Proteinaasi-K:n (10mg/ml) valmistaminen (30µl/näyte)

- 50 mM Tris-HCl, pH 8,0
- 1 mM CaCl_2

Ensin valmistettiin 50 mM Tris. pH-arvo säädettiin 8:aan HCl:lla, kuten edellä. Kiinteä CaCl_2 punnittiin ja se lisättiin 50 mM Tris-HCl-liuokseen.

20 % SDS:n valmistaminen (20µl/näyte)

- 50 g natriumdodekyylisulfaattia (SDS) ad 250 ml aqua
- 20 g natriumdodekyylisulfaattia (SDS) ad 100 ml aqua
- Ei autoklavoida. Huom. käytä hengityssuojainta punnittaessa.

SDS valmistettiin kahdessa osassa, jotta liukeneminen helpottui. SDS on luonnostaan heikosti liukenevaa ja kahdessa erässä liuottaminen nopeutti liuoksen tekemistä. Kun molemmat liuokset olivat liuenneet erikseen, voitiin ne yhdistää. SDS on haitallista ja kiinteänä pölyävää, siksi sitä punnittaessa on syytä käyttää hengityssuojainta (Dieffenbach & Dveksler 2003b, 500).

Hyviä liuoksenteko-ohjeita ja neuvoja niiden tekoon löytyy myös Internetistä. http://www.biocenter.helsinki.fi/bi/elatus/recipes_liuokset.htm#39 (University of Helsinki 2003).

Näytteenotto. Työohjeen testaaminen aloitettiin verinäytteenotolla. Näyttemateriaalina käytettiin omaa kokovertamme, joka otettiin aseptisesti näyttemateriaalia saastuttamatta. Ensimmäinen vaihe työstä oli DNA:n eristäminen, joka tehtiin itse tehdyillä liuoksilla sekä kaupallisella kitillä, tässä työssä MO BIO:n Ultra-Clean DNA:n eristyskitillä. Näyttemateriaaliksi kittieristykseen tarvittiin 3 ml ja eristykseen itse tehtyjen liuoksilla 500 µl EDTA-verta.

DNA:n eristäminen itse tehdyillä liuoksilla. 500 µl:aa näytettä pipetoitiin mikrosentrifugiputkeen, johon lisättiin punasolujen lyyssipuskuria. Punasolujen lyyssipuskuri hajottaa punasolut näytteestä. Sentrifugoinnin ja supernatantin poiston jälkeen pelletin päälle lisättiin 5xproteinaasi-K-puskuria, proteinaasi-K- ja SDS-liuosta, joiden tehtävä on hajottaa valkosolujen solukalvot ja tumakotelot. Liuoksen muuttuessa yhtenäiseksi, lisättiin NaCl:a, jolloin proteiinit saostuivat näytteestä. Sentrifugoinnin jälkeen supernatantti siirrettiin puhtaaseen mikrosentrifugiputkeen ja siihen lisättiin absoluuttista etanolia, jolloin DNA saostui silmin nähtäväksi. DNA siirrettiin lopulta puhtaaseen putkeen ja liuotettiin steriiliin veteen.

DNA:n eristäminen kaupallisella kitillä. 3 ml:n näyte kaadettiin ensin 15 ml:n muoviseen sentrifugiputkeen ja siihen lisättiin Solution G1-liuos (RBC Lysis Solution). Tällä käsittelyllä hajotettiin punasolut näytteestä. Tässä vaiheessa liuos muuttui ruskehtavaksi, johtuen punasolujen hajoamisesta syntyvästä jätteestä. Seuraavana hajottamisen kohteena olivat valkosolut, joka tapahtui lisäämällä kaupallista Solution G2-liuosta (Cell Lysis Solution). G2-liuoksen sisältämä SDS rikkoo solujen solukalvot. Tämän liuoksen lisäyksen jälkeen liuos muuttui sitkeäksi ja sitä oli vaikea sekoittaa. Sekoituksen ja suspensoinnin merkitys oli tärkeä, sillä niiden pois jättäminen olisi pienentänyt DNA:n saantia. Tämä johtuu siitä, että solut jäävät kaseihin eivätkä siksi hajoa tarpeeksi hyvin. Solujen hajoituksen jälkeen seurasi proteiinien saostus. Tämä tapahtui lisäämällä näytteeseen Solution G3-liuosta (Protein Precipitation Solution), joka neutraloi emäksisen G2-liuoksen ja saosti proteiinit. Tätä vaihetta seurasi sentrifugointi, jonka jälkeen DNA:ta sisältävässä supernatantissa ei enää ollut proteiinisakkaa. Proteiinien saostamisen jälkeen vuorossa oli DNA:n saostaminen, joka saatiin aikaan lisäämällä edellisessä vaiheessa eristettyyn supernatanttiin 100-prosenttista isopropanolia. Tässä vaiheessa DNA-rihma näkyi nesteessä. Sentrifugoinnin jälkeen supernatantti poistettiin ja näyte ilmakeivattiin. DNA-pelletti pestiin vielä 70-prosenttisella etanolilla. Propanoli-etanoli käsittelyssä oli tärkeää, että propanoli laitettiin ensin, koska etanoli ei jaksa yksin saostaa DNA:ta. Isopropanoli ja etanoli oli saatava saostuksen jälkeen tarkasti pois näytteestä, jotta se liukenisi. Lopuksi DNA liuotettiin Solution G4-liuokseen (DNA hydration solution) ja inkuboitiin 10 minuuttia 66 °C:ssa.

DNA:n pitoisuuden mittaaminen. Eristämisen jälkeen mitattiin DNA:n pitoisuus. Tästä saatiin selville kuinka paljon eristettyä DNA:ta näytteessä oli. DNA laimennettiin suhteessa 1:50, jonka jälkeen laimennoksen absorbanssi mitattiin spektrofotometrillä aallonpituudella 260 nm. Tämän jälkeen laskettiin DNA:n määrä absorbanssin perusteella. DNA:n pitoisuus lasketaan seuraavalla kaavalla:

$$\text{Abs} \times \text{verranto} \times \text{laimennuskerroin} = A_{260} \times 50 \times 50 = \mu\text{g/ml}.$$

Mitattujen pitoisuuksien avulla päätettiin, kuinka suuri näytemäärä PCR:ään tuli laittaa. Määrän tuli olla 0,025–0,05 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Tässä vaiheessa huomioitiin yksikön muunnos ($\mu\text{g}/\text{ml} \rightarrow \mu\text{g}/\mu\text{l}$). PCR-monistukseen tarvittiin 1 μl näytelaimennosta. Laimennosta tehtiin kuitenkin suurempi määrä, jotta näytteen käsittely ylipäättään mahdollistui.

PCR. Seuraava vaihe oli PCR (polymerase chain reaction). Työn tekeminen alkoi laimentamalla DNA-näytteet. Tämän jälkeen tehtiin seitsemänkertainen PCR-seos, josta pipetoitiin 29 μl jokaiseen putkeen. PCR-seos oli seitsemänkertainen siksi, koska näytteitä oli seitsemän. Seokseen tuli seuraavia aineita: dNTP:tä, aluketta 1, aluketta 2, 10xpuskuria, vettä sekä entsyymiä.

PCR-laitteeseen tehtiin sarja näytteistä. Tämän lisäksi sarjaan tuli myös 0-näyte ja alukekontrolli. 0-näytteeseen ei lisätty templaattia, eli tutkittavaa näytettä, eikä alukekontrolliin alukkeita. Jokaiseen näyteputkeen lisättiin 30 μl steriiliä mineraaliöljyä haihtumisen estämiseksi. PCR-monistuksen jälkeen näytteet siirrettiin öljyn alta uusiin steriileihin putkiin ja lisättiin 4 μl loading-puskuria jokaiseen putkeen. Näytteet pakastettiin odottamaan seuraavaa päivää.

Agaroosigeelielektroforeesi. PCR-monistuksen jälkeen DNA eroteltiin agaroosigeelielektroforeesilla. Ensin tuli valmistaa geeli. Ajoon tarvittava TBE-puskuri oli tehty edellisenä päivänä, koska sen piti antaa liueta vuorokausi. 2-prosenttisen agaroosigeelin valmistamiseen tarvittiin 3 g agaroosia sekä 150 ml TBE-puskuria. Geelin oli liuettava kokonaan puskuriiin, jotta DNA:n kulku geelis-

sä olisi mahdollisimman esteetöntä. Geeliä sekoitettiin koko ajan, ettei se jähmettyisi. Jäähdyneeseen geeliin lisättiin 5 µl etidiumbromidia. Geeli valettiin alustalle ja siitä poistettiin ilmakuplat steriilillä pipetinkärjellä. Geelikamman asettaminen geeliin muodosti näytteille kaivot. Geelin jähmettymisen jälkeen se siirrettiin ajoaltaaseen, joka täytettiin ajopuskurilla. Seuraavaksi näytteet ja kostandardit pipetoitiin näytekaivoihin. Näytteitä ajettiin 1,5 tuntia tarkkaillen niiden etenemistä 15 minuutin välein. Ajon päätyttyä tulosten tulkitseminen tapahtui UV-valossa.

Työohjeen testauksella oli tarkoitus varmistaa työohjeen toimivuus, ei niinkään saada määrällistä tulosta. Geeliltä nähtiin, että DNA oli monistunut ja näin ollen voitiin varmistua työohjeen toimivan. Testauksen aikana kävi ilmi, että työohje kaipasi joitakin pieniä muutoksia ja lisäyksiä. Näiden havaintojen perusteella työohjetta saatiin muokattua käyttäjäystävällisemmäksi, loogisemmaksi ja tarkemmaksi.

6.4 Työohjeen arvioiminen

Yksi kehittämistyön tehtävä oli pyytää arviointia laaditusta työohjeesta sekä asiantuntijalta että kohderyhmältä. Palautetta kerättiin arviointilomakkeella (kts. Liite 3.), joka lähetettiin arvioijille sähköpostilla yhdessä työohjeen kanssa. Arviointilomakkeen kysymykset käsittelivät sisältöä, ulkoasua, kieliasua sekä kokonaisuutta. Objektiivisen palautteen saaminen on tärkeää sillä tuotoksen tekijät voivat tulla sokeiksi omalle työlleen (vrt. Silfverberg 1997, 24; Vilkkä & Airaksinen 2003, 157).

Asiantuntijan arvio saatiin Marko Björniltä, joka on sekä bioanalyttikko että terveystieteenmaisteriopiskelija. Björn oli sopiva henkilö antamaan palautetta, koska hän on työskennellyt molekyylibiologian ja geeniteknologian työtehtävissä. Häneltä saatiin sekä välipalautetta että palaute lopullisesta tuotoksesta. Pääasialliset korjaukset, joihin hän keskittyi, olivat sisällöllisiä sekä kieliasullisia. Erityisesti virheitä oli englanninkielen oikeinkirjoituksessa. Sisällöllisiä asioita Björn oli korjannut useammasta kohdasta. Yhtenä esimerkkinä tästä oli PCR-seoksen valmistaminen. Hän antoi ammatillisen kokemuksensa perusteella ohjeen, mis-

sä järjestyksessä aineet kannattaa lisätä seokseen. Hän kehotti myös lisäämään työohjeeseen olennaisia tietoja, kuten entsyymien pitoisuuksia, jotta kohderyhmä voi tehdä työn ainoastaan käyttämällä kyseistä työohjetta.

Björn teki kieliasullisia tarkennuksia työohjeen teoriaosuuksiin. Hänen mielestään työohje olisi voinut sisältää enemmän teorian tietoa aiheesta. Teorian tietoa ei kuitenkaan lisätty, koska työohjeen haluttiin sisältävän vain olennaiset asiat (vrt. Ewles & Simnett 1995, 234). Liian tarkka kerronta aiheesta voi tehdä ohjeesta sekavan ja heikentää sen ymmärrettävyyttä. Työohjeiden ulkoasusta, kokonaisuudesta ja erityisesti kuvista saatiin myönteistä palautetta.

Työohje lähetettiin arvioitavaksi myös kohderyhmälle. Valitettavasti heiltä ei saatu vastausta määräajan loppuun mennessä ja näin ollen työohjeen arviointi kohderyhmän osalta jäi uupumaan. Heitä oli useaan otteeseen muistutettu vastaamaan kyselyyn ajoissa. Heille oli myös kerrottu, kuinka tärkeä heidän mielipiteensä on tämän kehittämistyön kannalta. Vastausaikaa ei kuitenkaan pystytty jatkamaan työn aikataulun vuoksi.

7 POHDINTA

Opinnäytetyömme idea sai alkunsa toisena lukuvuonna yhteisestä kiinnostuksesta molekyylibiologiaa ja geeniteknologiaa kohtaan. Toinen kiinnostuksen kohteemme oli kansainvälisyys, joka tuli mukaan, kun saimme yhteistyökumppaniksi korkea-asteen oppilaitoksen Instituto Superior de Ciências de Saúde Maputosta, Mosambikista. Kiinnostus kansainvälisyyteen lisääntyi myös opiskelijavaihdon aikana. Kohderyhmämme ilmaisema oppimateriaalin tarve molekyylibiologian ja geeniteknologian harjoituskokonaisuuteen tarkensi aihevalintaa ja näin ollen päädyimme tekemään oppimateriaalia DNA-tutkimusmenetelmistä. Toteutustavaksi muotoutui harjoituksiin tarkoitettu työohje. Idea oli kiinnostava,

monipuolinen ja ammatillisesti haastava, joten siitä oli helppo jatkaa prosessia eteenpäin.

Idean keksimisen jälkeen teorian kokoaminen lähti hyvin käyntiin, mutta työohjeen testaaminen viivästyi viimeiseen syksyyn. Yksi syy viivästymiselle oli opiskelijavaihto. Vaikka saimmekin teorian ja yleisen ajatusprosessin hyvälle mallille jo alkumetreillä, jäi meille vielä paljon työstettävää viimeiseen lukukauteen. Tämän seurauksena jouduimme työstämään opinnäytetyötä tiukalla aikataululla, jotta valmistuisimme tavoitteiden mukaisesti joulukuun 2009 mennessä.

Tavoitteiden toteutuminen. Opinnäytetyömme kehittämistyöllä oli kaksi välitöntä tavoitetta. Ensimmäinen oli havainnollisen oppimateriaalin laatiminen, ja toinen oli koulutuksen kehittäminen ISCISA:ssa. Koulutuksen kehittymistä emme pystyneet arvioimaan, koska siihen tarvitaan enemmän kokemusta harjoitustilanteista. Näin ollen keskityimme arvioimaan vain havainnollisen oppimateriaalin toteutumista oman suorituksemme kannalta.

Oppimateriaalin lajina käytimme työohjetta. Laadimme työohjeen käyttäen apuna tuotoksen arviointikriteerejä sekä kuva-analyysiä. Tuotoksemme visuaalinen ilme, luettavuus, käytettävyys, toimivuus sekä ammatillinen kiinnostavuus ovat mielestämme hiottu muottiin, johon parhaiten kykenimme. Työohjeen toimivuus ja käytettävyys taattiin omalla panoksellamme, kun testasimme työohjetta koulun laboratoriotiloissa. Luettavuus hiottiin ohjaavan opettajan, kielten opettajan sekä ulkopuolisen asiantuntijan antaman palautteen avulla. Hyvä visuaalinen ilme saatiin luotua teorian avulla sekä ripauksella omaa tyyliä. Ammatillisesti kiinnostavan työohjeesta tekee mielestämme havainnollistavat kuvat, innovatiivinen ja oivaltava teksti ja kuvien asettelu, kuvatekstit sekä kuvien rinnalla käytetyt nuolet. Kuvien valitsemisessa hyödynsimme sääntöä, että kuvassa tuli olla ainakin kaksi sisällöllistä merkitystä käsiteltävän aiheen kannalta. Tästä johtuen työohjeisiin valitsemamme kuvat olivatkin mielestämme informatiivisia sekä ymmärrystä lisääviä. Tämä on mielestämme tärkeä näkökulma, koska aihealue on vaikea ja sitä on mahdoton käsittää ainoastaan tekstiä lukemalla. Kuvallisia työohjeita käyttämällä opiskelija tietää esimerkiksi, miltä lopputuloksen tulisi näyttää ja pyrkii samanlaiseen lopputulokseen. Lopullinen työohje muodostui

edellä mainituista elementeistä. Mielestämme tavoite havainnollistavasta oppimateriaalista toteutui ja olemme tyytyväisiä lopputulokseen.

Pitkäaikaistavoitteena oli, että Mosambikin bioanalytiikan opiskelijat pystyvät hyödyntämään oppimaansa tietoa ja taitoa myöhemmin työelämässä. Tämän tavoitteen vaikutukset voidaan nähdä vasta pitkän ajan kuluttua, joten emme pysty arvioimaan niitä vielä tässä vaiheessa.

Kaikkia omia suunnitelmiamme ja kohderyhmän toiveita emme pystyneet toteuttamaan, joten jouduimme luopumaan muutamista ideoista. Kohderyhmämme oli ilmaissut selkeän tarpeen kuvalliselle materiaalille, kuten opetusvideolle. Videon tekemisestä kuitenkin luovuimme, koska sen tuottaminen olisi melko kallista, emmekä hallinneet riittäviä taitoja videointiin saati videon editointiin. Olisimme tarvinneet ulkopuolista apua, mikä olisi aiheuttanut lisäkustannuksia. Lisäksi videomateriaalin lähettäminen Mosambikiin olisi ollut ongelma. Videon tiedostokoko olisi ollut liian suuri ja näin ollen estänyt sähköpostilähetyksen. Videotiedoston kokoa ei myöskään ole järkevää mennä pienentämään kuvanlaadun kustannuksella. Päädyimme mielestämme hyvin perustein käyttämään havainnollistamisen keinona kuvia.

Suunnitteluseminaarin jälkeen mielessämme kypsyi idea myös käsiteluettelosta, jonka olisimme sijoittaneet raporttimme teoreettisen osan alkuun. Aiheemme on hyvin teoreettinen sisältäen paljon ammattisanoja ja siksi käsiteluettelo olisi voinut olla hyödyllinen. Luovuimme kuitenkin käsitteiden erillisestä luetteloinnista, koska selitimme tärkeimmät ja vaikeimmat sanat tekstissä niiden asiayhteydessä. Käsitteitä olisi myös tullut vähän lopulliseen luetteloon. Aikomuksenamme oli laittaa käsiteluettelo myös työohjeisiin. Luovuimme tästä osaltaan samoista syistä kuin edellisessä. Yhtenä syynä oli se, että aiemman Savonia-ammattikorkeakoulussa toteutetun opinnäytetyön tuotoksena oli syntynyt oppimateriaaleja saman aihealueen teoriasta. Tämä oppimateriaali sisälsi luettelon aihealueen keskeisistä käsitteistä. Näin ollen ajattelimme, että kohderyhmä voi hyödyntää aikaisemmin laadittua käsiteluetteloa harjoitustöiden ohella.

Saavuttamatta jäi myös suunnitelmien mukainen arviointi. Yritimme saada kohderyhmän arvion työohjeesta, mutta valitettavasti se jäi uupumaan, koska he eivät palauttaneet arviointilomaketta määräaikaan mennessä. Arvioinnin puuttuminen jäi harmittamaan, sillä se olisi lisännyt työohjeen luotettavuutta sekä sen avulla olisi voitu testata työohjeen sopivuutta kohderyhmälle. Onneksi kuitenkin saimme asiantuntijan arvioinnin.

Luotettavuus. Lähdemateriaalimme ovat pääosin 2000-luvulla kirjoitettuja teoksia, mutta muutamia 90-luvulla kirjoitettuja lähteitä on myös otettu mukaan. Tämä johtuu siitä, että laatimassamme työohjeessa käytettävät DNA-perustutkimusmenetelmät on kehitetty jo useita vuosia sitten, eivätkä niiden periaatteet ole olennaisesti muuttuneet. Lisäksi alan uusimmat teokset sisältävät lähinnä PCR:n kehittyneimpiä sovelluksia, kuten Real-Time PCR. Aiemmiltä kursseilta saatu asiantuntijuus auttoi meitä suhtautumaan kriittisesti sekä vanhan että uuden lähdemateriaalin antamiin tietoihin. Lähdemateriaalin kirjoittajina on pääasiallisesti professoreita, opettajia sekä muita asiantuntijoita, mikä lisää lähteiden luotettavuutta. Verkkolähteiden käytössä olimme todella kriittisiä ja päädyimmekin käyttämään ainoastaan aineistoa, joka oli peräisin joko yliopiston sivuilta tai tunnettujen asiantuntijoiden laatimilta sivustoilta. Kokonaisuudessaan käyttämässämme lähdemateriaalissa on tasapuolisesti sekä suomen- että englanninkielisiä lähteitä.

Kehittämistyötä tehdessä ymmärsimme millainen vastuu meillä on oppimateriaalin laatijoina. Jos laatimamme työohje on ainoa oppimateriaali, jota kohderyhmä käyttää molekyylibiologian ja geeniteknologian harjoitustöissä, sen on oltava luotettava. Tämä lisäsi paineita meille työohjeen laatimisessa, sillä tiedon tuli olla virheetöntä ja asianmukaista. Näiden asioiden vuoksi suhtauduimme käyttämämme tiedon luotettavuuden arviointiin hyvin kriittisesti.

Kehittämishaasteet. Rajatessa opinnäytetyömme aihealuetta, ulkopuolelle jäi monia hyviä ideoita, joista voisi kehittää aiheen uusille opinnäytetöille. Työstäessämme työohjetta mietimme monessa vaiheessa, tulevatko työohjeemme oikeasti käyttöön vai voiko joku epäselvyys estää niiden hyödyntämisen opetuksessa. Emme tienneet olivatko Huttusen ja Lahden (2007) opinnäytetyön tuot-

tamat oppimateriaalit menneet opetuskäyttöön. Tämän takia emme voineet arvioida myöskään tuottamamme oppimateriaalin hyödynnettävyyttä ja se vaikutti myös meidän motivaatioon. Kehittämishaasteena voisikin olla Maputoon lähetettävien oppimateriaalien vaikuttavuuden ja merkityksen arviointi bioanalytiikan koulutusohjelmassa. Opinnäytteen aihe voisi soveltua kyseiseen kohteeseen vaihtoon lähteville opiskelijoille. Näin ollen jos oppimateriaalien vaikuttavuudesta saadaan positiivisia tuloksia, voisi tarpeita vastaavaa oppimateriaalia työstää lisää. Yksi tällainen oppimateriaalin muoto voisi olla opetusvideo DNA-tutkimusten perusmenetelmistä. Tarve tämän aihealueen opetusvideolle ilmaistii jo Huttusen ja Lahden (2007, 31) opinnäytetyössä.

Kehittämistyötä tehdessä heräsi ajatuksia, mitä mahdollisuuksia DNA-tutkimukset voisivat tuoda Mosambikin terveydenhuoltoon. Mikä merkitys Mosambikille olisi DNA-tutkimusten käytöstä diagnostiikassa? Millaisia mahdollisuuksia se loisikaan tutkimukselle, jos heillä olisi riittävästi tietoa ja taitoa toteuttaa DNA-tutkimuksia? Ja kuinka paljon saataisiin uutta tietoa mosambikilaisten monimuotoisesta geeniperimästä tutkijoiden käyttöön? Näihin kysymyksiin voitaisiin osaltaan vastata laatimalla uutta oppimateriaalia ISCISA:n bioanalytiikan koulutusohjelmaan. Koulutuksen antamat tiedot ja taidot voivat tulevaisuudessa vaikuttaa DNA-tutkimusten leviämiseen myös Mosambikin terveydenhuoltoon opiskelijoiden kautta.

Eettisiä kysymyksiä. Eettisiä kysymyksiä tulee miettiä, kun tehdään yhteistyötä ihmisten kanssa, joiden kulttuuri on aivan erilainen kuin omamme. Leclair (2008, 112-113) avaa artikkelissaan, että se, mikä on moraalisesti oikein toisessa kulttuurissa, ei välttämättä ole oikein toisessa ja mikä on oikein yhtenä aikana, ei ehkä ole oikein toisena aikana. Onko etiikka siis vakio vai muuttuko se riippuen ajasta ja paikasta? (Leclair 2008, 112–113.) Emme voi olettaa, että se mikä on oikein meidän kulttuurissa tai yhteiskunnassa Suomessa, on oikein myös Mosambikissa kohderyhmämme kulttuurissa. Emme siis voi tietää, miten DNA-tutkimusmenetelmiä sisältävä työohje otetaan vastaan heidän kulttuurissaan, vaikka täällä lopputulosta pidettäisiin huolellisesti ja harkitusti laadittuna.

DNA-tutkimuksia tehdessä tulee ottaa huomioon myös niiden eettiset puolet, esimerkiksi yksityisyyden suojele. Tutkittavalla henkilöllä on oikeus tietää omaan terveyteensä liittyvistä seikoista sekä hänellä on myös oikeus olla tietämättä niistä (Meincke 2001, 63–64). Tästä syystä menetelmien tutkimuskohteena on turvallista käyttää VNTR-alueen identifikaatiota. VNTR-alue on diagnostisesti harmiton, koska se ei sisällä informaatiota, joka kertoisi yksilön terveyteen liittyvistä seikoista.

Oman oppimisen arviointi ja ammatillinen kasvu. Tämä opinnäytetyöprosessi on ollut meille kaikille haaste. Se vei runsaasti aikaa sekä vaati paljon panostusta ja uhrauksia. Tämän opinnäytetyön työstäminen on kuitenkin kasvattanut meitä niin ammatillisesti kuin ihmisinäkin. Välillä kaikki tuntui ylittämättömältä tuskalta ja toisinaan taas kaikki onnistui ensimmäisellä kerralla. Haastavinta oli ryhmätyöskentely, koska se vaati kärsivällisyyttä, päättävyyttä, kompromisseja ja organisointikykyä. Samalla siinä oli kuitenkin ryhmän tuki koko ajan läsnä. Päätöksistä ja vaikeista asioista pystyi keskustelemaan toisten kanssa, jolloin oli helpompi nähdä eri vaihtoehdot. Näkökulmien erilaisuus tuotti vaikeuksia ryhmän välillä, jolloin joustavuus oli valttia. Uskomme kuitenkin, että muun muassa raportin kieliasu on yhteneväisempää, koska tekstiä luotiin yhdessä kriittisin ottein. Lisäksi yksin kirjoittaessa tulee helposti sokeaksi omalle tekstilleen.

Tämän opinnäytetyön ansiosta meille avautui mahdollisuus kehittää omia ammatillisia kiinnostuksen kohteita. Meillä kaikilla oli vahva kiinnostus molekyylibiologiaan ja geeniteknologiaan, joten oli luonnollista valita opinnäytetyön aihe juuri siltä alueelta. Aiheen teoria DNA-tutkimusmenetelmistä oli jo aiempien opintojen kautta osaltaan meille tuttua, mutta sitä piti kuitenkin palautella uudestaan mieleen ja syventää etsimällä lisää tietoa kirjallisuudesta. Oman mielenkiintonsa tähän oppimistehtävään toi myös oppimateriaalin laatiminen. Yllättävintä oli se, miten paljon hyvän oppimateriaalin luominen vaatii sen tekijöiltä. Materiaali täytyi ensin luoda tiettyjen kirjallisuudesta saatujen kriteereiden sanelemana ja tämän jälkeen lopullinen tuotos vaati vielä arviointeja.

Työohjeen testausvaiheessa ammatillisesti haastavinta oli ehdottomasti liuosten valmistaminen. Meidän täytyi selvittää matematiikan- ja kemiantunteja muistellen sekä vanhoja muistiinpanoja selaillen, kuinka kemian laskukaavoja käytettiin. Huomasimme, etteivät nämä asiat olleetkaan enää tuoreessa muistissa. Suunnitellessa liuoslaimennoksia ja laskettaessa massoja, moolimassoja, tilavuuksia sekä muita suureita, aikaa kului paljon. Oman aikansa veivät myös laskujen perusteella tehdyt punnitukset ja liuotukset sekä pH-arvojen säätäminen. Ajan lisäksi liuosten valmistaminen vaati huolellisuutta, uuden tiedon oppimista, vanhan kertaamista sekä toisaalta omaan harkintaan ja ammattitaitoon luottamista.

Kielitaidon, sekä ammattikielen että englannin kielen, osaaminen on karttunut huomattavasti tämän opinnäytetyön työstämisen aikana. Kehitystä on tapahtunut sekä suullisessa että kirjallisessa ilmaisussa. Aihealueemme terminologia on tämän kehittämistyön jälkeen huomattavasti vaivattomampaa käyttää, kun sanojen merkityksen on todella sisäistänyt. Myös keskustelu aiheeseen liittyvistä asioista on välillämme helpompaa. Meidän ei tarvitse selittää alusta alkaen toisillemme jotain aiheeseen liittyvää asiaa, vaan jokainen tietää mistä puhutaan. Tällaisissa tilanteissa kokee olevansa jollain tasolla asian ammattilainen. Englanninkielisen tekstin lukeminen lähdekirjallisuudesta on puolestaan kehittänyt vieraan kielen ymmärtämistä. Vastaavasti tekstin tuottaminen on kehittänyt taitoja englanninkielisen kirjallisessa hallinnassa. Haastavinta kirjallisen tekstin tuottamisessa oli se, että kummankaan osapuolen, ei meidän eikä kohderyhmän, äidinkieli ole englanti. Tämän vuoksi käyttämämme englanti ei ainoastaan pitänyt olla kielipölisesti oikein, vaan myös helposti ymmärrettävää. Päädyimme kuitenkin kielenkäytössä linjaan, jossa pyrimme välttämään tuntemattomia sanoja ja vaikeita lauserakenteita, mutta kuitenkin käyttämään aihealueen ammattisanoja ja yleisesti käytettyjä termejä.

Tämän opinnäytetyöprosessin jälkeen meillä on useita vahvuuksia työelämään siirtyessä. Olemme koko tämän prosessin aikana harjoitelleet ryhmä- ja projektityötaitoja ja kehittyneetkin niissä huomattavasti. Työelämässä vaaditaankin jatkuvasti parempia ryhmätyötaitoja. Laboratoriotiede kehittyy vauhdilla ja molekyylibiologia ja geeniteknologia onkin merkittävä osa nykypäivää. Tämän perusteel-

la voimme pitää valttikorttina sitä, että meillä on tietoa ja kokemusta molekyyli-biologian ja geeniteknologian erikoisalasta. Lisäksi prosessin aikana meillä kaikilla on ammattikieli kehittynyt erityisesti englanninkielessä. Ammattikielen hallinta englanniksi, opiskelijavaihto sekä kansainvälinen yhteistyökumppani osoittaa kiinnostusta kansainvälisyyttä kohtaan. Uskomme kielitaidon ja aidon halun oppia myös muista kulttuureista olevan hyvä meriitti tulevassa työnhaussa. Tekninen taito, kuten liuosten tekeminen ja pipetoiminen, on tärkeä osa laboratorio-työtä. Saimme hyvää kertausta ja harjoitusta teknisistä taidoista työohjetta testatessa. Vahva tekninen osaaminen lisää omaan ammattitaitoon luottamista. Kaikki nämä edellä mainitut seikat kertovat halusta oppia ja kasvaa oman alansa asiantuntijaksi.

LÄHTEET

Brown, T.A. 1990. Gene Cloning. An Introduction. 2. painos. London: Chapman & Hall.

Brown, T.A. 2005. Genetics. A molecular approach. 3. painos. United Kingdom: Bios Scientific Publishers.

Brownie, A.C. & Kernohan J.C. 2005. Medical biochemistry. A core text with self-assessment. 2. painos. London: Elsevier Churchill Livingstone.

Coen, D. M. 2006. The Polymerase Chain Reaction. Current Protocols in Molecular Biology. 15.0.1-15.0.2.

Dawson, M.T., Powell, R. & Gannon, F. 1996. Gene Technology. Introduction to biotechniques. Oxford: BIOS Scientific Publishers.

Dieffenbach, C.W. & Dveksler, G. S. 2003a. Sample preparation. Teoksessa C.W. Dieffenbach & G.S. Dveksler (toim.) PCR Primer. A Laboratory Manual. Second Edition. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 83-85.

Dieffenbach, C.W. & Dveksler, G. S. 2003b. Cautions. Teoksessa C.W. Dieffenbach & G.S. Dveksler (toim.) PCR Primer. A Laboratory Manual. Second Edition. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 491-501.

Ewles, L. & Simnett, I. 1995. Terveiden edistämisen opas. Sairaanhoitajien koulusäätiö. Keuruu: Otava.

Frilander, M. 2006. DNA ja geenisäätelyn periaatteet. Teoksessa P. Aula, H. Kääriäinen & A. Palotie (toim.) Perinnöllisyyslääketiede. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim, 14–30.

Hirvonen, K. 2008. Steriloinnin tavoite ja käsitteitä. Teoksessa H. Hirvonen, T. Karhumäki ja E. Tuominen (toim.) Välinehuolto. Helsinki: Duodecim, 207–208.

Huttunen, T.-M. & Lahti, M. 2007. DNA:n ominaisuudet ja tutkimusmenetelmät – Opetusmateriaalia bioanalyttikko-opiskelijoille Mosambikiin. Savonia - ammattikorkeakoulu. Bioanalytiikan koulutusohjelma. Opinnäytetyö.

Hyvärinen, R. 2005. Millainen on toimiva potilasohje? Hyvä kieliasu varmistaa asian perillemenon. Duodecim 121 (16), 1769-1773.

Hänninen, H., Ruismäki, M., Seikola, A. & Slöör, S. 2007. Laboratoriotyön perusteet. Helsinki: Edita.

Ikävalko, E. 1994. Käytännön tiedottaminen. Yhteisöviestinnän käsikirja. Helsinki: Tietopaketti Oy.

Itkonen, M. 2005. Typografia ja luettavuus. Teoksessa L. Leskelä & H. Virtanen (toim.) Toisin sanoen. Selkokielen teoriaa ja käytäntöä. Opike. Helsinki: Kehitysvammaliitto ry, 72-86.

Jeronen, E. 2005a. Oppimisympäristöt. Teoksessa V. Eloranta, E. Jeronen & I. Palmgren (toim.) Biologia eläväksi. Biologian didaktiikka. Jyväskylä: PS-kustannus, 183–198.

Jeronen, E. 2005b. Resurssien valitseminen, valmistaminen ja käyttö. Teoksessa V. Eloranta, E. Jeronen & I. Palmgren (toim.) Biologia eläväksi. Biologian didaktiikka. Jyväskylä: PS-kustannus, 198–216.

Laaksonen, S. 2005. Oppimisen avaimet luento-opetuksessa. Helsingin yliopisto. Käyttätymistieteellinen tiedekunta. Kasvatustieteen laitos. Pro gradu. E-
Thesis Helsingin yliopiston verkkojulkaisut. Viitattu 4.11.2009.

<http://urn.fi/URN:NBN:fi-fe20051440>

Leclair, S. J. 2008. Bioethics – Problems for Today. Focus: Bioethics. Journal of the American Society for Clinical Laboratory Science 21 (2), 112-113.

Lehtinen, E., Kuusinen, J. & Vauras, M. 2007. Kasvatuspsykologia. Kasvatustiede. Helsinki: WSOY Oppimateriaalit Oy.

Linko, L., Ahonen, E., Eirola, R. & Ojala, M. 2000. Laboratoriopalvelut hoitotyön tukena. Helsinki: WSOY.

Manninen, J., Burman, A., Koivunen, A., Kuittinen, E., Luukannel, S., Passi, S. & Särkkä, H. 2007. Oppimista tukevat ympäristöt. Johdatus oppimisympäristö ajatteluun. Helsinki: Opetushallitus.

Manuel A. 2008. Laboratorioalan professori. ISCISA, Maputo, Mosambik. Suullinen tiedonanto 22.10.2008.

Martin, R. 1996. Gel electrophoresis: Nucleic acids. Introduction to biotechniques. Oxford: BIOS Scientific Publishers.

Meincke, N. 2001. Geenitestit. Oikeudellisia kysymyksiä. Helsinki: Kauppakaari, Lakimiesliiton Kustannus.

Nadder, T.S. & Langley, M.R. 2001. The New Millennium Laboratory: Molecular Diagnostics Goes Clinical. Focus: Molecular Diagnostic Testing. Journal of the American Society for Clinical Laboratory Science 14 (4), 252-259.

Orpana, A. & Huoponen, K. 2006. Geeni- ja kromosomimuutosten laboratorio diagnostiikka. Teoksessa P. Aula, H. Kääriäinen & A. Palotie (toim.) Perinnöllisyyslääketiede. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim, 268–280.

Palmberg, I. 2005. Koeputkilaboroinnit ja kokeilut. Teoksessa V. Eloranta, E. Jeronen & I. Palmgren (toim.) *Biologia eläväksi. Biologian didaktiikka*. Jyväskylä: PS-kustannus, 121.

Palotie, L. 2006. Perinnöllisyyslääketiede kohtaa kansalaisen. Harvinaisten tautien diagnostiikasta koko perimän hoitovaste-analyysiin. Teoksessa P. Aula, H. Kääriäinen & A. Palotie (toim.) *Perinnöllisyyslääketiede*. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim, 6-7.

Parkkunen, N., Vertio, H. & Koskinen-Ollonqvist, P. 2001. Terveysaineiston suunnittelun ja arvioinnin opas. Terveystieteen tutkimuskeskuksen julkaisuja – sarja 7/2001. Helsinki: Terveystieteen tutkimuskeskus.

Penttilä, I. 2003. Kromosomi- ja molekyylibiologiset menetelmät. Teoksessa I. Penttilä (toim.) *Kliiniset laboratoriotutkimukset*. Helsinki: WSOY, 114–118.

Rajala, P. 1990. Selkokirjoittajan opas. Helsinki: Punamusta.

Sarajärvi, A. 2003. Käytännön harjoittelu oppimisympäristönä. Teoksessa H. Kotila (toim.) *Ammattikorkeakoulupedagogiikka*. Helsinki: Edita, 170–184.

Silfverberg, P. 1997. Ideasta projeksi. Projektisuunnittelun käsikirja. 3.painos. Helsinki: Hallinnon kehittämiskeskus. Edita.

Smith, C., Otto, P., Bitner, R. & Shield, G. 2003. DNA Purification. Teoksessa C.W. Dieffenbach & G.S. Dveksler (toim.) *PCR Primer. A Laboratory Manual*. 2. painos. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 87-115.

Suomen suurlähetystö, Maputo. 2009. Tietoa Mosambikista. Päivitetty 28.8.2009. Viitattu 18.11.2009.

<http://www.finland.org.mz/public/default.aspx?contentid=143099>

Suominen, I. & Ollikka, P. 1996. Yhdistelmä-DNA-tekniikan perusteet. Internet-versio. 2. painos. Helsinki: Opetushallitus. Päivitetty 1996. Viitattu 20.8.2009.
<http://www.edu.fi/oph/abc/dna/perus.html>

Suominen, I. & Ollikka, P. 1997. Yhdistelmä-DNA-tekniikan perusteet. 2. painos. Helsinki: Opetushallitus.

Tervonen, P. 2004. Mitä ovat tuotevastuu, toimintaohje ja työohje? Päivitetty 15.3.2004. Viitattu 8.4.2008.
http://www.vantaa.fi/i_perusdokumentti.asp?path=1;135;137;221;1761;2460;2471;2472

Thermo Fisher Scientific Oy. 2008. Finnpiipettien käyttö, kalibrointi ja huolto. Tuote-esite.

Ulkoasiainministeriö. 2006a. Mosambik. Päivitetty 2006. Viitattu 18.11.2009.
<http://global.finland.fi/public/default.aspx?nodeid=15790&contentlan=1&culture=fi-FI>

Ulkoasiainministeriö. 2006b. Koulutus kaikille – myös kehitysmaissa. Päivitetty 2006. Viitattu 23.10.2009.
<http://global.finland.fi/public/default.aspx?nodeid=15804&contentlan=1&culture=fi-FI>

University of Helsinki. 2003. Institute of Biotechnology. Recipes. Päivitetty 2003. Viitattu 16.10.2009.
http://www.biocenter.helsinki.fi/bi/elatus/recipes_liuokset.htm#39

Vilka, H. & Airaksinen, T. 2003. Toiminnallinen oppinäytetyö. Helsinki: Tammi.

Voytas, D. 2000. Preparation and Analysis of DNA. Current Protocols in Molecular Biology. John Wiley & Sons, Inc. 2.5A.1-2.5A.9.

Vuorio, E. 2002. DNA ja geeni. Teoksessa P. Aula, H. Kääriäinen & J. Leisti (toim.) Perinnöllisyyslääketiede. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim, 17–20.

Watson, J.D., Baker, T.A., Bell, S.P., Gann, A., Levine, M. & Losick, R. 2008. Molecular Biology of the Gene. Pearson International Edition. 6. painos. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Wiio, O. & Puska, P. 1993. Terveysviestinnän opas. Keuruu: Otava.

Liite 1. Yleiset työskentelyohjeet.

Common working instructions

Complement-DNA techniques are difficult and very sensitive for contamination. This sets certain criteria for working methods. These requirements must be strictly followed. Down below there are some working methods to be considered.

- Using controls is very important even if it wouldn't be mentioned separately (for example agarose gel size standards). In general you can easily conclude what went wrong with help of controls.
- Working techniques should follow the requirements of microbiological and good work hygienic orders. Working should be also sterile. You should remember this when you are working with nuclei acids because they are very sensitive for contamination. Contamination can effect essentially on final result.



Picture 1.

Use disinfection often when working with DNA

- Protecting from contamination isn't only enough. Many harmful materials/substances (for example ethidiumbromide) are used in complementary DNA techniques. Therefore you should pay attention to your own safety.
- All the instruments, materials and substances which are in contact with research organisms have to be sterilized so the possible microbe contamination can be avoided.
- Sterile working also requires nuclei-free conditions. This means that you have to sterilize all instruments by heating up with autoclave before use. With this method the enzymes which degrades DNA, are destroyed. The other option is to use already sterilized disposable instruments. Nucleases are material which you can find everywhere like on skin. That's why is important to use disposable gloves and change them often enough. Nucleases can be destroyed by heating up the solution to +65°C for 10 minutes.
- Some things to be considered in nuclei-acid works:
 - It's necessary to change pipette tips after every pipetting so you can avoid the risk of sample contamination. In addition some solutions are very expensive and sensitive for contamination (for example enzymes).
 - Also it is important to keep track of storing the substances because normally they are quite valuable
 - The storage box of pipette tips should be closed when they are not used.
 - Sometimes it is hard to pipette viscose liquids. A good example of these kinds of substances is enzymes which contain glycerol. In this case it is very important to pay attention to pipetting techniques and practice first with less expensive liquids (for example cold 50% glyserol).
 - Pipettes should be calibrated and cleaned before use.

- When pipetting small amounts you should lift the tube to the height of your eyes. This way you can make sure that the solution which you are pipetting is going to the desired place (Look the picture 2.). When starting pipetting piston of pipette is pressed down and the tip is put just under the surface of the liquid. The tip is held a few seconds before it's filled. After this pipette is filled by lifting the piston slowly and steadily. This is a very good way to pipette viscose liquids.
- The tip of pipette should be carefully attached to the pipette so there will be no air instead of liquid
- When pipetting small amounts it's usually very precise how much of the substance should be in the final solution. Therefore the liquid which is outside of the pipette tip should be considered. You can get rid of this product for example by swinging the tip around against the inner surface of the tube. After this the tip of pipette should be transferred to the destination tube just under the surface and piston should be pushed down. Make sure that the liquid ends up to the destination tube.



Picture 2.

When pipetting small amounts you should lift the tube to the height of your eyes.

- In a DNA-laboratory there are sometimes used harmful solutions and other harmful materials, so it is necessary to agree with valid safety instructions.
 - One harmful solution is ethidium bromide which is used for detection of DNA in agarose gel. Ethidium bromide is a mutagen and potential carcinogen. Every time when you are dealing with ethidium bromide you should wear safety gloves and other protective clothing. Ethidium bromide waste is disposed like toxic waste.
 - UV light, in other words ultraviolet light, is needed to visualize and to photograph agarose gel. Protective glasses should be worn when using UV light. Protection should be effective enough against to UV radiation. Bare skin should not be exposed to UV light so it should be avoided.

References:

Dieffenbach, C.W. & Dveksler, G. S. (edit.). 2003. PCR Primer. A Laboratory Manual. Second Edition. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.

Suominen, I. & Ollikka, P. Yhdistelmä-DNA-tekniikan perusteet. Internet-version. Opetushallitus. Referred 26.8.2009.

<http://www.edu.fi/oph/abc/dna/perus.html>

Liite 2. Työohje DNA-tutkimusmenetelmille

DNA-identification

The idea of this practice is to identify differences in human genome. In chromosome 1 there is located a fragment called VNTR-area (variable number tandem repeat) which is 16 base pairs long. Depending of the individual this DNA- fragment is repeated 15-41 times which makes it 240-656 base pairs long. In this practice you will find out how many times approximately this VNTR- area is repeated in each individual. The sample material is isolated DNA from white blood cells. The practice consists following stages →

1. Isolation of genomic DNA from white blood cells

You can use either manual method (1.a) or commercial kit-method (1.b)

2. Measuring the concentration of isolated DNA

3. PCR amplification

4. Agarose Gel Electrophoresis

5. Visualizing and reading the results

1.a) Manual isolation of genomic DNA from white blood cells

DNA isolation is a necessary part of the DNA identification process. This isolation method provides the opportunity to both isolate source materials for amplification and purify amplification products. DNA can be isolated from a wide range of starting materials like tissues, cultured cells and whole blood. From whole blood, the other blood components (red blood cells, membranes of white blood cells and nuclear cortex) must be removed before DNA is suitable for PCR amplification.

Required materials:

- blood sample (500 µl EDTA-blood)
- red blood cell lysis buffer
- 5xproteinase- K-buffer
- proteinase-K
- 20 % SDS
- sterile aqua
- 6 M NaCl
- absolute ethanol
- incubating device (+55°C)
- micro centrifuge and micro centrifuge tubes

Solutions

Red blood cell lysis buffer (1ml/sample)

- 0,32M sucrose
- 1% Triton x-100
- 5mM MgCl₂
- 12mM Tris-HCl , pH 7,25 *

5xproteinase-K-buffer (80 µl/sample)

- 0,375M NaCl
- 0,12M EDTA, pH 8,0 * **

Proteinase-K (30mg/ml) (30µl/sample)

- 50mM Tris-HCl pH 8,0 *
- 1mM CaCl₂

20% SDS (20µl/sample)

- 50g Sodium Dodecyl sulfate/ad 250ml aqua
- 20g Sodium Dodecyl sulfate/ad 100ml aqua
- After dissolved separately, mix SDS solutions
- This substance should not be autoclaved. Use respirator mask when you weight SDS.

TE-buffer

- 10mM Tris-HCl, pH 7,5 or 8,0 *
- 1mM EDTA

* Use NaOH and HCl to adjust pH-value

** EDTA will not dissolve before it is getting closer to pH 8,00

Isolation process

- Pipet 500 μ l EDTA blood to micro centrifuge tube. Add 1 ml red blood cell lysisbuffer. Mix tube by turning it upside down couple of times.
 - Centrifuge 1minute 13 000 rpm. → Remove the supernatant.
 - Wash the pellet with 1 ml aqua. Centrifuge 1 minute 13 000 rpm. → Remove the supernatant.
 - Suspend the pellet by adding 80 μ l 5xproteinase-K-buffer, 30 μ l proteinase-K, 20 μ l SDS and 240 μ l aqua on to it. Keep the tube in +55°C 10 minutes. Mix at intervals. Try to get as homogenous solution as possible.
 - Add 100 μ l 6 M NaCl and vortex the tube intensively 15 seconds.
 - Centrifuge 5 minutes 13 000 rpm.
 - Transfer the supernatant to new clean micro centrifuge tube. Be careful not to take proteins with you. Add 1 ml absolute ethanol. Mix tube by turning it upside down a couple of times.
- DNA will precipitate and it is visible
- Transfer the DNA to new clean micro centrifuge tube where there is 100 μ l aqua. Dissolve the DNA with vortex intensively 30 seconds.
 - Concentration of isolated DNA should be around 0,3 μ g/ μ l. Obtained DNA-solution (2-5 μ l) can be used PCR- reaction.



Picture 1. Precipitated DNA should be visible

1.b) DNA isolation with the kit

DNA isolation is a necessary part of the DNA identification process. This isolation method provides the opportunity both to isolate source materials for amplification and purify amplification products. DNA can be isolated from a wide range of starting materials like tissues, cultured cells and whole blood. From whole blood, the other blood components (red blood cells, membranes of white blood cell and nuclear cortex) must be removed before DNA is ready for PCR amplification.

Required materials:

- **MO BIO, Blood DNA Isolation Kit.** Attention, when you are using other producers' kit they may have own instructions.
- **70 % ethanol**
- **Isopropanol**
- **15 ml centrifuge tubes and other instruments**
- **Distilled water**
- **Centrifuge**
- **Vortex**
- **incubating device (+65°C)**

Collect the starting material

- Take the blood sample to 3 ml EDTA tube following aseptic working
- Pour sample to 15 ml centrifuge tube

DNA isolation

- Red blood cell lysis:
 - Add 9 ml RBC lysis solution and mix carefully couple of times
 - incubate 5 minutes at room temperature
 - Centrifuge (4000 rpm, 5 minutes)
 - Remove supernatant and mix by using vortex



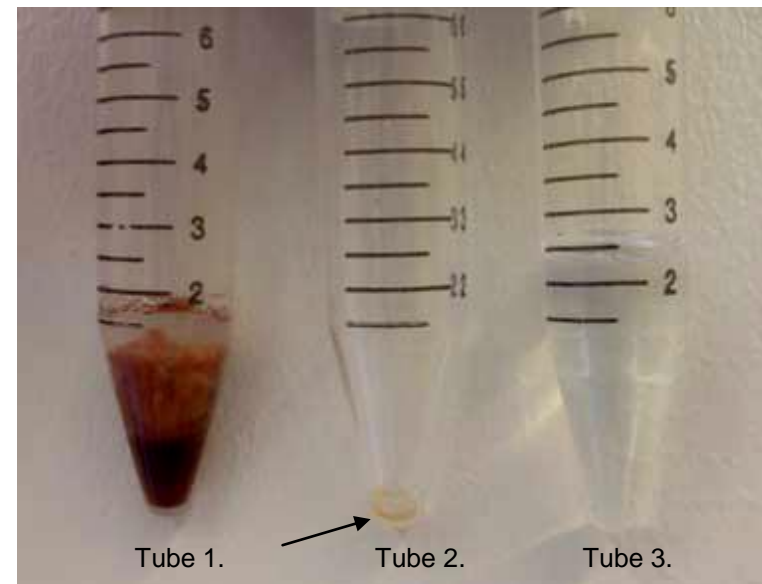
Picture 2. Mixing blood sample and RBC lysis solution

- Lysis of the white blood cells and their nuclear membrane:
 - Add 3 ml Cell lysis solution
 - Mix carefully until liquid is homogeneous



Picture 3. After white blood cell lysis the solution reminds Coca-Cola.

- Protein precipitation:
 - Add 1 ml protein precipitation solution
 - Vortex 15 seconds
 - Centrifuge (4000 rpm, 5 minutes) → Dark brown protein pellet should be visible. Supernatant contains the DNA.



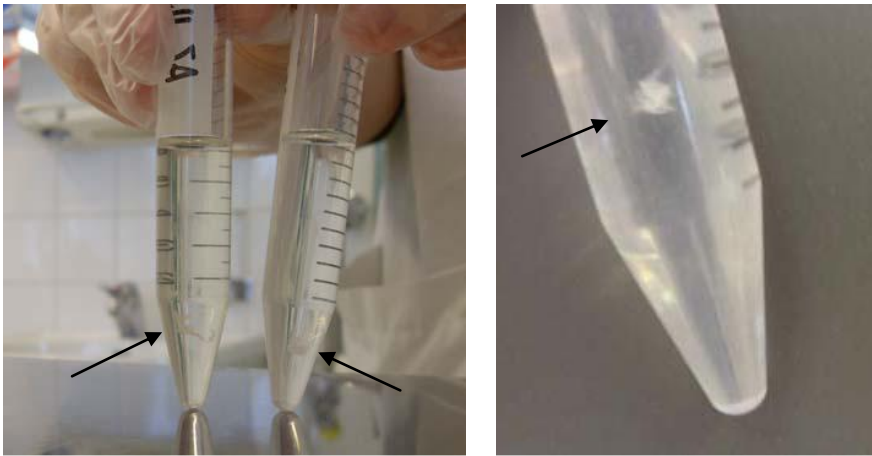
Picture 4.

After adding protein precipitation solution and the sample is centrifuged. After that the DNA supernatant has been moved from tube 1. to tube 2.

After second centrifugation the supernatant has been moved from tube 2. to tube 3. Small amount of protein can still be seen in tube 2.

Tube 3. contains the pure protein-free DNA supernatant.

- DNA precipitation
 - Transfer supernatant to a 15 ml centrifuge tube
 - Add 3 ml 100% Isopropanol
 - Gently mix the solution by inverting 15 times
 - Incubate 3 minutes at room temperature



Pictures 5. and 6. After adding isopropanol and inverting the tube 15 times, the DNA should have become visible.

- Centrifuge (4000rpm 10 minutes) → DNA will be a small visible pellet
- Pour the supernatant and air-dry the tube over a paper
- Add 3 ml 70 % ethanol to the DNA and gently invert the tube 5 times to wash the DNA pellet and sides of the tube
- Centrifuge (4000rpm 3 minutes)
- Pour ethanol away carefully

- Centrifuge (4000rpm 5 minutes) and carefully remove the rest of ethanol by using pipette
- Air-dry the pellet 10–15 minutes. After the pellet has dried it should be translucent. Caution! If the pellet is not translucent repeat ethanol wash and centrifuging.



Picture 7. After centrifuging and removing supernatant the white DNA-pellet is visible.

- Dissolving DNA
 - Add 250 μ l DNA Hydration Solution liquid to the tube
 - Incubate 10 minutes +65°C or in room temperature over night

2. Measuring the concentration of the isolated DNA

- Dilute dissolved DNA 1:50 with sterile water
- DNA yield can be measured with spectrophotometer by absorbance at 260 nm wavelength
- Count amount of DNA (absorbance value of 1,0 indicates DNA content to be 50µg/ml)
- Choose the amount of sample for PCR considering the concentration of DNA
(DNA-sample concentration should be around 0,025 – 0,05 µg/µl)

3. PCR (polymerase chain reaction)

PCR amplifies particular segment of DNA. The idea is simply to produce millions of clones of specific DNA segment. This procedure is carried out entirely biochemically, *in vitro*. The thermostable DNA polymerase enzyme synthesizes specific DNA fragment between the two primers. Changes in temperature during PCR is essential for denaturation, annealing and extension in multiplying process. (Watson 2008, 751)

Required materials :

- **Template DNA, which is used as a model in synthesis**
- **DynaZyme-PCR-reagentpack** (10 mM dNTP, 10xbuffer, DynaZyme DNA-polymerase) Attention, when you are using other producers' kit they may have own instructions.
- **Primers D 1S80 1 and 2**
 1. **(100 pmol/μl)** 5` - GAA ACT GGC CTC CAA ACA CTG CCC GCC G - 3`
 2. **(100 pmol/μl)** 5` - GTC TTG TTG GAG ATG CAC GTG CCC CTT GC - 3`
- **Sterile materials: water, mineral oil, tubes, filtered pipet tips and ice block**
- **PCR- device** (MiniCyclerTM, MJ Research)
- **microcentrifuge**
- **6xloading buffer**

PCR- amplification process

- Melt reagents with your hands. → mix well tapping with your finger → centrifuge shortly → keep on ice.
- Dilute DNA-sample to 0,025 – 0,05 μg/μl (Look previous chapter, Measuring the concentration of DNA)
- Prepare reaction master mix (amounts are towards one sample):
 - Add 24,1 μl sterile H₂O
 - Add 0,6 μl dNTP- mix
 - Add 0,5 μl primer 1
 - Add 0,5 μl primer 2
 - Add 3 μl 10 × buffer
 - Finally add 0,3 μl DNA polymerase enzyme
- Mix the mixture by gently tapping with your finger and then centrifuge shortly. Keep mixture on ice.
- Pipet 1 μl diluted DNA sample into PCR-tube and add 29 μl PCR- reaction master mix.
- Prepare also 0-sample/negative control (add 1 μl of sterile water instead of template DNA)
- Prepare also primer-control (do not add primers)
 - add 25,1 μl water
- Add 30 μl sterile mineral oil to each reaction mixture.

- Mix tubes by gently tapping them with your finger and centrifuge shortly.

- Program PCR:

→ cycle 1	denaturation	95 °C	5 minutes
	annealing	59,5 °C	0,5 minutes
	extension	72 °C	1 minute
→ cycles 2 - 28	denaturation	95 °C	1 minute
	annealing	59,5 °C	0,5 minutes
	extension	72 °C	1 minute
→ cycle 29	denaturation	95 °C	1 minute
	annealing	59,5 °C	0,5 minutes
	extension	72 °C	5 minutes
→ Soak- phase down.		Cools samples down to + 4 °C, until PCR is shut down.	

- Place tubes firmly in the holes in PCR.
- Close the lid.
- Start the PCR.
- In the end of the program centrifuge tubes shortly before opening them. Put tubes on the ice.
- Remove samples from beneath mineral oil to new sterile tubes.

- For 30 µl PCR product add 4 µl 6xloading buffer and mix properly.
- If samples are not analyzed immediately, keep them in – 20 °C.



Picture 8. PCR has been programmed and the sample tubes are firmly placed in the holes in PCR.



Picture 9. 6xLoading puffer has been added to the sample. Keep samples on the ice until electrophoresis.

4. Agarose Gel Electrophoresis

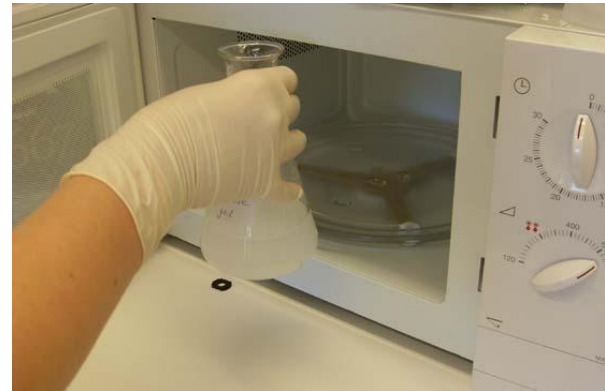
After PCR, DNA has to be separated with electrophoresis. Agarose gel electrophoresis is based on a fact that the charged molecules move in an electrical field. DNA is negatively charged so it will move towards to positive electrode. Molecules with different size can be separated because they will move with different speed in porous gel.

Required materials:

- **Electrophoresis buffer** (TBE-buffer)
- **Ethidium bromide solution** 10mg/ μ l (Caution: Ethidium bromide is a carcinogen!)
- **Agarose**
- **DNA molecular weight markers** (λ Hae III/Hind III or λ Hae III)
- **Horizontal gel electrophoresis apparatus**
- **Gel casting platform**
- **Gel comb**
- **DC power supply**
- **UV light source**
- **Sterile instruments**

Prepare 2 liters 0,5 x TBE-buffer to prepare the gel and to fill in the electrophoresis tank.

Weight 3 g agarose to an Erlenmeyer and add 150 ml TBE-buffer. Melt the agarose in a microwave oven and swirl to ensure the mixing. Avoid heating up too much! Melted agarose should be cooled ($> 60^{\circ}\text{C}$) before adding ethidium bromide. Add 5 μ l ethidium bromide. Avoid bubbles, when mixing!



Picture 10. Agarose powder dissolves after heating it in a microwave oven. While heating observe that the gel doesn't over boil.



Picture 11. Gel is ready when no particles can be seen.

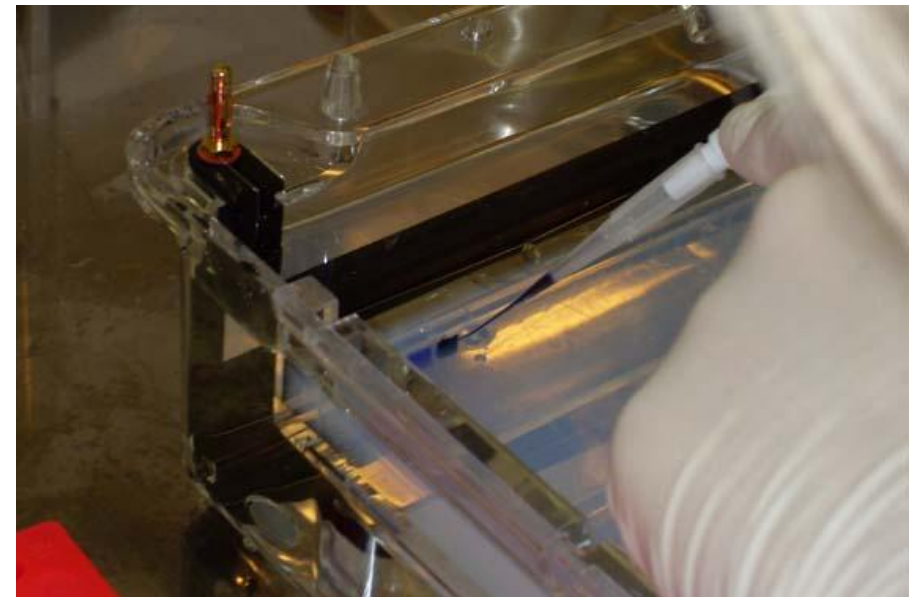
Seal the gel casting platform if it is open at the ends (for example with adhesive tape). Pour the melted agarose onto the gel platform and insert the gel comb. Make sure that there are not any bubbles trapped underneath the comb and all bubbles on the surface are removed before gel sets. It takes about 30 minutes that the gel is solid. After the gel has become solid, remove the tape from the open ends of the gel platform and withdraw the gel comb. Place the gel casting platform containing the set gel to electrophoresis tank and fill the tank with TBE-buffer. Add TBE-buffer to cover the gel to a depth of about 1 mm.



Pictures 12. and 13. After adding ethidium bromide, gel is poured to gel platform. Gel comb is put on its' place right after pouring the gel. In picture 13 gel has become solid 30 minutes and comb has been gently removed leaving sample wells behind.

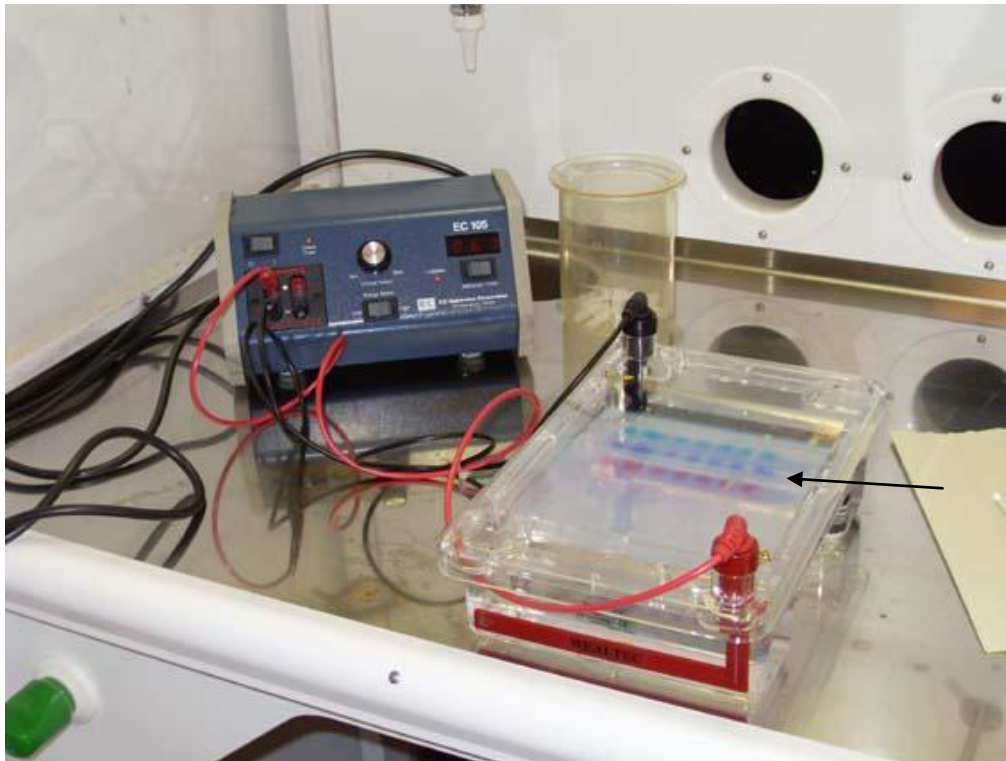
DNA samples should be prepared in volume that they will not overflow the gel wells. This sample preparation has been done straight after PCR. (Look previous chapter: PCR)

Samples are typically loaded into wells with micropipette. Load 30 μ l of each sample to wells. Load also 30 μ l DNA molecular weight markers to the wells. Be careful, that you don't mix the samples between wells. When pipetting samples to wells, always use filtered pipet tips.



Picture 14. Molecule weight markers and samples are loaded carefully into the wells.

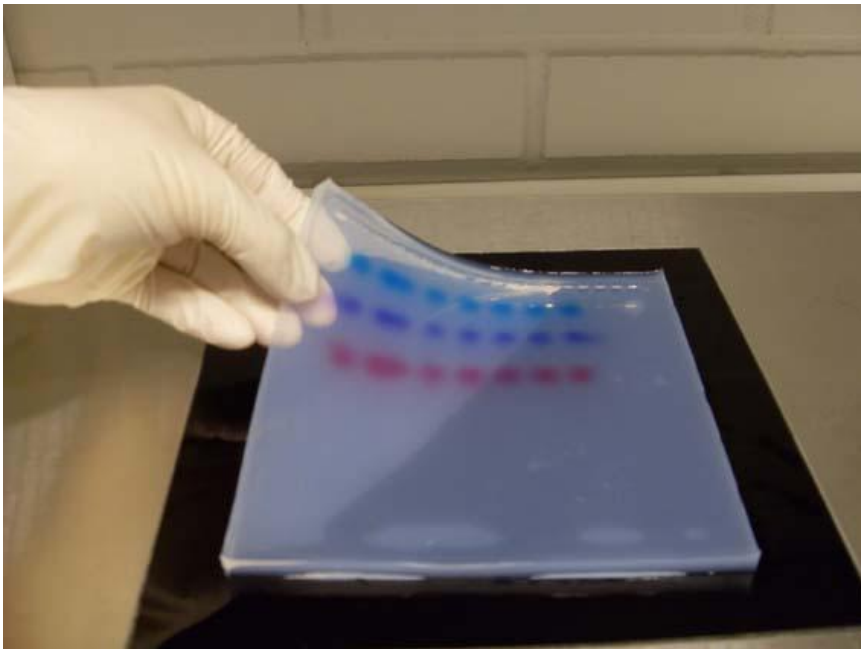
Be sure that the leads are attached so that the DNA will move into the gel toward the positive leads. Set the voltage to 67. The progress of the separation can be monitored by the movement of the dyes in the loading buffer. You should be sure that DNA fragments migrate to the right direction. Turn off the power supply when the bromphenol blue dye from the loading buffer has moved to a sufficient distance to separate of the DNA fragments. Normally it takes one to two hours.



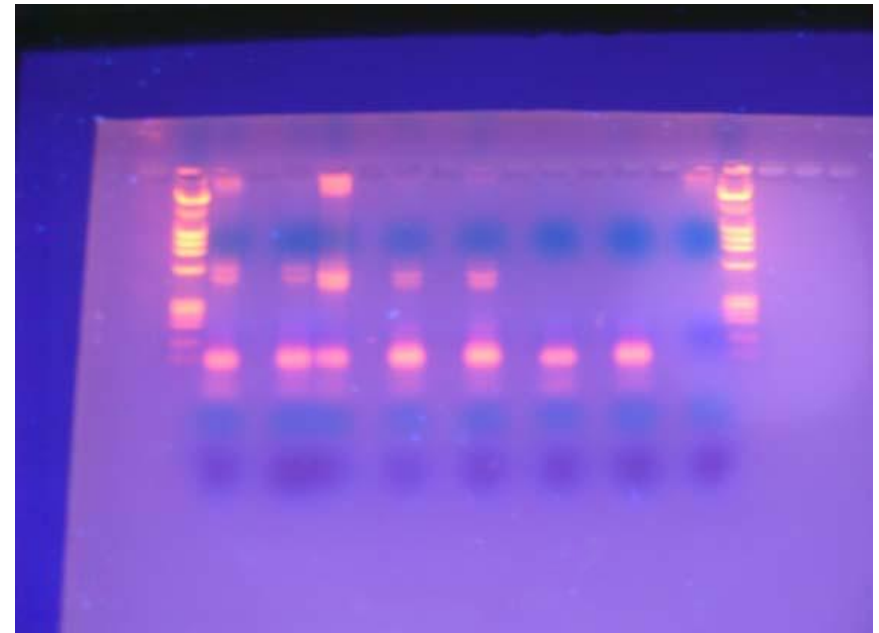
Picture 15. In this picture the separation process is almost done. The movement of the dyes can easily be seen.

5. Visualizing the results

DNA fragments can be visualized by placing the gel on a UV light source. DNA can be seen because it contains ethidium bromide. The visualized gel can be photographed directly. To analyze the size of the VNTR-area in DNA it is compared to molecular weight markers.



Picture 16. Gel has been carefully removed from the platform and it is put on top of the UV-light screen.



Picture 17. The results can be seen after turning the lights off and putting the UV-light on. Molecular weight markers can be seen on each side. The samples and control samples on the middle.

References:

Brown, T.A. 2005. Genetics. A molecular approach. Third edition. United Kingdom: Bios Scientific Publishers.

Brownie, A.C. & Kernohan J.C. 2005. Medical biochemistry. A core text with self-assessment. Elsevier Churchill Livingstone, 176.

Coen, D. M. 2006. The Polymerase Chain Reaction. Current Protocols in Molecular Biology. 15.0.1-15.0.2

Dawson, M.T., Powell, R. & Gannon, F. 1996. Gene Technology. Introduction to biotechniques. BIOS Scientific Publishers.

Dieffenbach, C.W. & Dveksler, G. S. 2003a. Sample preparation. Teoksessa C.W. Dieffenbach & G.S. Dveksler (toim.). PCR Primer. A Laboratory Manual. Second Edition. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 83.

Dieffenbach, C.W. & Dveksler, G. S. 2003b. Cautions. Teoksessa C.W. Dieffenbach & G.S. Dveksler (toim.). PCR Primer. A Laboratory Manual. Second Edition. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 500.

Martin, R. 1996. Gel electrophoresis: Nucleic acids. Introduction to biotechniques. BIOS Scientific Publishers.

Orpana, A. & Huoponen, K. 2006. Geeni- ja kromosomimuutosten laboratoriodiagnostikka. In writing P. Aula, H. Kääriäinen & A. Palotie (edit.). Perinnöllisyyslääketiede. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim, 272.

Smith, C., Otto, P., Bitner, R. & Shield, G. 2003. DNA Purification. Teoksessa C.W. Dieffenbach & G.S. Dveksler (toim.). PCR Primer. A Laboratory Manual. Second Edition. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 87-115.

Suominen, I. & Ollikka, P. 1997. Yhdistelmä-DNA-tekniikan perusteet. Helsinki: Opetushallitus.

Suominen, I. & Ollikka, P. Yhdistelmä-DNA-tekniikan perusteet. Internet-version. Opetushallitus. Referred 26.8.2009.

<http://www.edu.fi/oph/abc/dna/perus.html>

University of Helsinki. 2003. Institute of Biotechnology. Recipes. Updated 2003. Referred 16.10.2009.

http://www.biocenter.helsinki.fi/bi/elatus/recipes_liuokset.htm#39

Voytas, D. 2000. Preparation and Analysis of DNA. Current Protocols in Molecular Biology. John Wiley & Sons, Inc. 2.5A.1-2.5A.9

Vuorio, E. 2002. DNA ja geeni. In writing P. Aula, H. Kääriäinen & J. Leisti (edit.). Perinnöllisyyslääketiede. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim, 17-20.

Watson, J.D., Baker, T.A., Bell, S.P., Gann, A., Levine, M. & Losick, R. 2008. Molecular Biology of the Gene. Pearson International Edition. Sixth edition. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Liite 3. Työohjeen arviointilomake

Please read the working instructions about DNA-identification and give us feedback about following matters.

1. The content of the instructions:

Which things are good about content?
Which things are bad about content?
What should be done other ways? How?

2. The outfit of the instructions:

Which things are good about outfit?
Which things are bad about outfit?
What should be done other ways? How?

3. Linguistic form in the instructions:

Which things are good about the language?
Which things are good about the language?
What should be done other ways? How?

4. The entirety of the instructions:

Good and bad aspects about the instructions?
What should be done other ways? How?

Thank you for your interest.